

SVEUČILIŠTE U ZAGREBU
PREHRAMBENO-BIOTEHNOLOŠKI FAKULTET

DIPLOMSKI RAD

Zagreb, srpanj 2017.

Marta Jakopec

795/MB

**PROCJENA UČINKA
NESTEROIDNIH PROTUUPALNIH
LIJEKOVA U KULTURAMA
ŽIVOTINJSKIH STANICA**

Rad je izrađen u Laboratoriju za tehnologiju i primjenu stanica i biotransformacije na Zavodu za biokemijsko inženjerstvo Prehrambeno-biotehnološkog fakulteta Sveučilišta u Zagrebu pod mentorstvom doc.dr.sc. Kristine Radošević.

Zahvaljujem se mentorici doc.dr.sc. Kristini Radošević na posvećenom vremenu, trudu i prenesenom znanju tijekom provođenja eksperimenata i pisanja ovog rada.

Veliko hvala mojoj obitelji, a posebno roditeljima, na iznimnoj potpori i bodrenju tijekom studija.

Za kraj, zahvaljujem se mom dragom Alenu, na svojoj podršci tijekom izrade ovog rada.

TEMELJNA DOKUMENTACIJSKA KARTICA

Diplomski rad

Sveučilište u Zagrebu
Prehrambeno-biotehnološki fakultet
Zavod za biokemijsko inženjerstvo
Laboratorij za tehnologiju i primjenu stanica i biotransformacije

Znanstveno područje: Biotehničke znanosti

Znanstveno polje: Biotehnologija

PROCJENA UČINKA NESTEROIDNIH PROTUUPALNIH LIJEKOVA U KULTURAMA ŽIVOTINJSKIH STANICA

Marta Jakopec, 795/MB

Sažetak: Nesteroidni protuupalni lijekovi (NSAID, eng. *nonsteroidal anti-inflammatory drug*) intenzivno se istražuju posljednjih desetljeća obzirom na njihov antitumorski potencijal te smanjenje rizika za razvoj i napredak malignih bolesti njihovom primjenom. Cilj ovog rada je ispitati *in vitro* učinak 25 različitih NSAID-ova na humanim staničnim linijama te antitumorski potencijal i mehanizam djelovanja onih s najizraženijim citotoksičnim učinkom. Ispitani NSAID-i imaju potencijal kao antitumorski lijekovi obzirom na njihov jači antiproliferativni učinak na tumorske stanice, MCF-7, HepG2 i HeLa, nego na HEK293T stanice porijeklom iz zdravog tkiva, za koje su izračunate najveće vrijednosti IC_{50} . Mogući mehanizmi djelovanja NSAID-a uključuju indukciju apoptoze, koja je značajnija kod tumorskih stanica nego kod normalnih stanica, te indukciju zastoja staničnog ciklusa u G_0/G_1 fazi odgovornu za antiproliferacijski učinak u tumorskim staničnim linijama.

Ključne riječi: *nesteroidni protuupalni lijekovi, antitumorska aktivnost, kulture stanica, apoptoza, stanični ciklus*

Rad sadrži: 53 stranice, 15 slika, 3 tablice, 93 literaturna navoda

Jezik izvornika: hrvatski

Rad je u tiskanom i elektroničkom (pdf format) obliku pohranjen u: Knjižnica Prehrambeno-biotehnološkog fakulteta, Kačićeva 23, Zagreb

Mentor: *Doc.dr.sc. Kristina Radošević*

Stručno povjerenstvo za ocjenu i obranu:

1. Izv.prof.dr.sc. *Ivana Kmetić*
2. Doc.dr.sc. *Kristina Radošević*
3. Prof.dr.sc. *Višnja Gaurina Srček*
4. Prof.dr.sc. *Ksenija Durgo* (zamjena)

Datum obrane: 20. srpnja 2017.

BASIC DOCUMENTATION CARD

Graduate Thesis

University of Zagreb
Faculty of Food Technology and Biotechnology
Department of Biochemical Engineering
Laboratory for Cell Technology, Application and Biotransformations

Scientific area: Biotechnical Sciences
Scientific field: Biotechnology

EFFECTS ESTIMATION OF NONSTEROIDAL ANTI-INFLAMMATORY DRUGS IN ANIMAL CELL CULTURES

Marta Jakopiec, 795/MB

Abstract: Nonsteroidal anti-inflammatory drugs (NSAID) have been intensively investigated in the last decades in view of their anticancer potential and reducing the risk of developing and progressing malignant diseases by their application. The aim of this paper is to examine the *in vitro* effect of 25 different NSAIDs on human cell lines and the anticancer potential and mechanism of action of those with the most potent cytotoxic effect. Studied NSAIDs have potential as antitumor drugs due to their stronger antiproliferative effect on tumor cells, MCF-7, HepG2 and HeLa than on HEK293T cells derived from healthy tissue that have the highest calculated IC₅₀ values. Possible mechanisms of NSAIDs action include induction of apoptosis, which is more significant in tumor cells than in normal cells, and induction of cell cycle arrest in the G₀/G₁ stage responsible for the antiproliferative effect in tumor cell lines.

Keywords: *nonsteroidal anti-inflammatory drugs, antitumor activity, cell cultures, apoptosis, cell cycle*

Thesis contains: 53 pages, 15 figures, 3 tables, 93 references

Original in: Croatian

Graduate Thesis in printed and electronic (pdf format) version is deposited in: Library of the Faculty of Food Technology and Biotechnology, Kačićeva 23, Zagreb.

Mentor: *PhD. Kristina Radošević, Assistant professor*

Reviewers:

1. PhD. *Ivana Kmetič*, Associate professor
2. PhD. *Kristina Radošević*, Assistant professor
3. PhD. *Višnja Gaurina Srček*, Full professor
4. PhD. *Ksenija Durgo*, Full professor (substitute)

Thesis defended: 20 July 2017

Sadržaj

1. UVOD	1
2. TEORIJSKI DIO	2
2.1. Povijest NSAID-ova.....	2
2.2. Mehanizam djelovanja NSAID-ova	3
2.2.1. Mehanizam djelovanja ciklooksigenaza	3
2.2.1.1. Oblici ciklooksigenaza	4
2.3. Klasifikacija NSAID-ova	6
2.4. Toksičnost NSAID-ova	8
2.5. Antikancerogeno djelovanje NSAID-a.....	8
2.5.1. Inhibicija COX-2 i antitumorska aktivnost	9
2.5.2. Suzbijanje proliferacije inhibicijom staničnog ciklusa.....	10
2.5.3. Indukcija apoptoze.....	10
2.5.4. Represija angiogeneze	10
2.6. <i>In vitro</i> ispitivanje citotoksičnosti primjenom kulture životinjskih stanica.....	11
2.6.1. Pregled <i>in vitro</i> ispitivanja antitumorske aktivnosti NSAID-a primjenom kultura stanica .	12
2.6.2. <i>In vitro</i> i <i>in vivo</i> učinak NSAID-ova na kolorektalni karcinom	14
3. EKSPERIMENTALNI DIO	16
3.1. MATERIJALI	16
3.1.1. Otopine NSAID-ova.....	16
3.1.2. Kemikalije	17
3.1.3. Otopine i puferi	17
3.1.4. Humane stanične linije	18
3.1.5. Uređaji i oprema	19
3.2. METODE	20
3.2.1. Uzgoj stanica	20
3.2.2. Određivanje broja stanica metodom tripan-plavo i tretman NSAID-ovima.....	20
3.2.3. Određivanje preživljenja stanica MTS metodom	21
3.2.4. Protočna citometrija.....	22
3.2.4.1. Određivanje tipa stanične smrti primjenom Muse™ Annexin V & Dead Cell Kita	23
3.2.4.2. Određivanje zastoja u staničnoj diobi primjenom Muse™ Cell Cycle Kita.....	25
3.3. OBRADA REZULTATA.....	26
4. REZULTATI I RASPRAVA	27
4.1. <i>In vitro</i> ispitivanje citotoksičnosti NSAID-ova	28

4.2. Određivanje mehanizma citotoksičnog djelovanja NSAID-ova protočnom citometrijom.....	36
4.2.1. Učinak NSAID-a i stanična smrt.....	36
4.2.2. Učinak NSAID-a i stanična dioba	40
5. ZAKLJUČCI	42
6. LITERATURA.....	43

1. UVOD

Nesteroidni protuupalni lijekovi (NSAID, eng. *nonsteroidal anti-inflammatory drug*) pripadaju raznovrsnoj skupini lijekova s analgetskim, antipiretskim i protuupalnim djelovanjem (Vane, 2000). Oni su jedni od najčešće korištenih lijekova u svijetu, koje svakodnevno koristi preko 30 milijuna ljudi te su prvi odabir u terapiji reumatskih poremećaja i drugih degenerativnih upalnih bolesti. Mehanizam djelovanja NSAID-ova prvi su opisali 1971.g. Vane i Piper, koji su dokazali da oni inhibiraju biosintezu prostaglandina sprječavanjem vezanja supstrata, arahidonske kiseline, u aktivno mjesto enzima ciklooksigenaze (COX) (Vane i Botting, 1998). Postoje dvije izoforme ciklooksigenaza: COX-1 koja je konstitutivno eksprimirana i katalizira proizvodnju prostaglandina uključenih u brojne fiziološke funkcije te COX-2 koja je inducirana faktorima rasta, tumorskim promotorima te onkogenima i prekomjerno je eksprimirana u brojnim tumorima kod sisavaca te se povezuje s procesom tumorigeneze (Chi i sur., 2009). Stoga se posljednjih desetljeća intenzivno istražuju NSAID-i obzirom na njihov antitumorski potencijal budući da mnoge studije ukazuju na smanjenje rizika od razvoja i napretka malignih bolesti njihovom primjenom. Pretpostavlja se kako je antitumorska aktivnost NSAID-a posljedica inhibicije aktivnosti enzima COX-2, dok novije studije ukazuju na to da neki NSAID-ovi imaju antitumorsko djelovanje neovisno o COX-2 inhibiciji što govori u prilog dodatnim mehanizmima djelovanja tih lijekova (Chi i sur., 2009). Studije pokazuju da je COX-2 prekomjerno eksprimiran u mnogim ljudskim tumorima gdje djeluje na razvoj tumora stimulacijom proliferacije tumorskih stanica, povećanjem tumorske angiogeneze, sprečavanjem apoptoze stanica raka, modulacijom imunoregulacijskih reakcija i pojačavanjem metastaza tumora.

U ovom radu istražit će se *in vitro* učinak 25 različitih NSAID-ova na humanim staničnim linijama, te će oni s najizraženijim citotoksičnim učinkom biti ispitani s obzirom na njihov antitumorski potencijal. Primjenom analizatora staničnog zdravlja Muse™ i odgovarajućih kitova kvantificirat će se tip stanične smrti, odnosno postotak stanica u fazama G₀/G₁, S i G₂/M staničnog ciklusa kako bi se eventualno zapaženi učinci ispitivanih NSAID-ova povezali s mogućim mehanizmom njihovog djelovanja.

2. TEORIJSKI DIO

Nesteroidni protuupalni lijekovi (eng. *nonsteroidal anti-inflammatory drug*, NSAID) predstavljaju raznoliku grupu lijekova, a svima im je zajedničko analgetičko, protuupalno i antipiretsko djelovanje. Najčešće su korišteni analgetici u svijetu, unatoč tome što je njihova dugotrajna uporaba povezana s nizom različitih nuspojava. Korištenje NSAID-a, a naročito njihova kronična uporaba, povećava se s dobi pacijenta, pri čemu se procjenjuje da 10-40% osoba starijih od 65 godina koristi dnevno propisane NSAID-ove (Hawkey i sur., 2000). Poznato je da su svi NSAID-ovi povezani s različitim stupnjem gastrointestinalnog i kardiovaskularnog rizika, a poboljšanje u smislu smanjenja neželjenih nuspojava omogućili su tzv. selektivni NSAID-ovi koji imaju sličnu učinkovitost kao tradicionalni NSAID-ovi, ali su blaži za gastrointestinalni sustav.

2.1. Povijest NSAID-ova

Analgetski učinak NSAID-ova zapravo je poznat već više od 5000 godina kada su ljudi koristili koru vrbe za ublažavanje mišićno-koštane boli, no tada naravno nisu znali da je to učinak NSAID-a kao djelatne tvari. Aktivni sastojak iz kore vrbe, salicin, izoliran je tek 1828.g., dok je industrijska proizvodnja salicilne kiseline počela 1874.g. Možda najpoznatiji NSAID, aspirin (acetilsalicilna kiselina) razvijen je 1897.g., dok su indometacin i ibuprofen bili među prvim NSAID-ovima koji su uslijedili nakon aspirina, 1964.g. i 1969.g. Ubrzo nakon njih, uslijedile su mnoge nove klase NSAID-ova, uključujući diklofenak 1974.g. i naproksen 1976.g. (Brune i Hinz, 2004; Jones, 2001). Tzv. tradicionalni ili klasični NSAID-ovi inhibiraju obje izoforme enzima ciklooksigenaze (COX), ali imaju za posljedicu izraženu gastrointestinalnu (GI) toksičnost. 1990-ih godina došlo je do velikog napretka u razvoju ove skupine lijekova, nakon uvođenja dva nova visoko selektivna inhibitora COX-2, poznatih kao koksibi (celekoksib i rofekoksib) za koje je pokazano da imaju nižu toksičnost za gastrointestinalni sustav te da su obzirom na neželjene nuspojave bolji nego tradicionalni NSAID-ovi. Iako su spomenuti lijekovi djelomično ispunili navedena očekivanja, 2004.g. došlo je do zaokreta kada je rofekoksib povučen diljem svijeta zbog ozbiljnih kardiovaskularnih nuspojava.

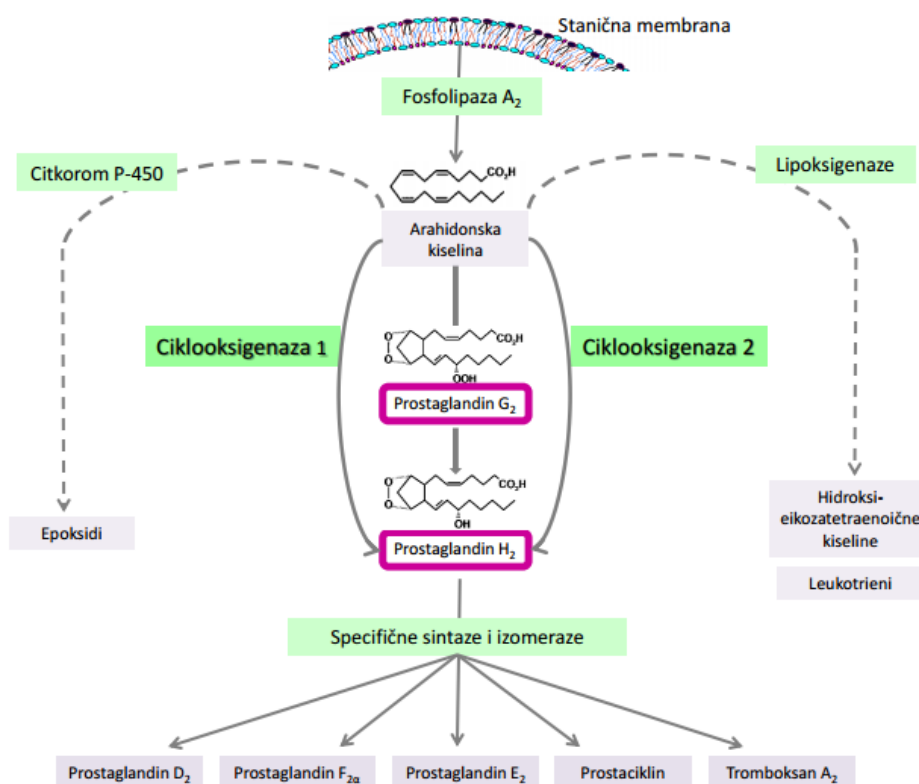
2.2. Mehanizam djelovanja NSAID-ova

1960-tih godina J. R. Vane proučavao je novo otkrivenu grupu signalnih molekula, u koje spadaju i prostaglandini, koji su uzrokovali bol, oticanje i crvenilo te utjecali na kontrakcije glatkog mišićja, uključujući maternicu. Na sve navedene pojave djelovao je aspirin te je Vane pretpostavio da aspirin na neki način blokira sintezu prostaglandina. Proveo je *in vitro* ispitivanje NSAID-a na stanicama zamorca kao izvoru prostaglandin sintaze te je 1971.g. prvi put opisano njihovo djelovanje čime su Sir John Vane i Piper dokazali da NSAID-ovi blokiraju biosintezu prostaglandina inhibicijom enzimske aktivnosti prostaglandin H sintaze (također nazvana ciklooksigenaza). Inhibitorno djelovanje NSAID-a se očituje u sprječavanju vezanja arahidonske kiseline, supstrata, u aktivno mjesto COX enzima (Vane i Botting, 1998) čime NSAID-ovi sprječavaju stvaranje prostaglandina H_2 , prvog međuprodukta u metabolizmu arahidonske kiseline. Time se zaustavlja mogućnost daljnje biosinteze niza signalnih lipida, kao što su prostaglandin D_2 , prostaglandin E_2 , prostaglandin F_2 , prostaglandin I_2 te tromboksana.

2.2.1. Mehanizam djelovanja ciklooksigenaza

Arahidonska kiselina je nezasićena masna kiselina od 20 ugljikovih atoma ugrađena u fosfolipidima membrane stanica koja se pod utjecajem hormonskih i proteolitičkih signala oslobađa iz membrane djelovanjem fosfolipaze A_2 te djeluje kao signalna molekula. Također, arahidonska kiselina je prekursor za sintezu eikozanoida, biološki aktivnih molekula sa širokim spektrom djelovanja u normalnim fiziološkim uvjetima kao i u raznim patološkim stanjima. Razlikujemo tri puta u metabolizmu arahidonske kiseline ovisno o enzimu koji sudjeluje u reakciji. Lipooksigenaze kataliziraju sintezu hidroksi-eikozatetraenoičnih kiselina i leukotriena, citokrom P-450 katalizira sintezu epoksida, dok ciklooksigenaze sudjeluju u sintezi prostanoida (Smith, 1989; Sigal, 1991; Cook, 2005; Wang i Dubois, 2010; Cathcart i sur., 2011). COX veže arahidonsku kiselinu i prevodi u prostaglandin H_2 (PGH_2) dvijema enzimskim reakcijama, ciklooksigenaznom kojom se arahidonska kiselina prevodi u prostaglandin G_2 (PGG_2) te peroksidaznom kojom se prostaglandin G_2 (PGG_2) reducira do prostaglandina H_2 (PGH_2). Zatim se nestabilni intermedijer prostaglandin H_2 (PGH_2) pomoću specifičnih sintaza i izomeraza prevodi u prostanoidne, biološki aktivne lipide s lokalnim

autokrinim i parakrinim hormonskim djelovanjem, koji obuhvaćaju prostaglandine, prostacikline i tromboksane (slika 1) (Breyer i sur., 2001; Smyth i sur., 2009; Woodward i sur., 2011). Razlikujemo prostaglandin E₂ (PGE₂), prostaglandin F_{2α} (PGF_{2α}), prostaglandin D₂ (PGD₂), prostaciklin (PGI₂) i tromboksan A₂ (TXA₂). Njihova sinteza je uz druge čimbenike uvjetovana i COX izoformom koja je predominantna u sintezi prostaglandina H₂ (PGH₂) u toj stanici.

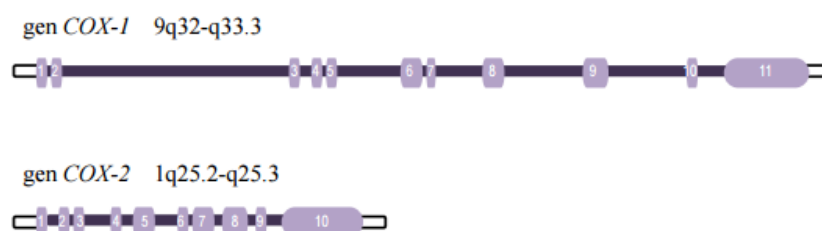


Slika 1. Uloga ciklooksigenaza u biosintezi prostanoida (Catela Ivković, 2014)

2.2.1.1. Oblici ciklooksigenaza

U stanicama sisavaca identificirane su dvije različite izoforme ciklooksigenaza, COX-1 i COX-2. Kodirane su s 2 različita gena, COX-1 je okarakteriziran 1976.g., a gen za izoenzim COX-2 otkriven je kasnije 1991.g. (Vane i Botting, 1998). Iz visokog stupnja homologije (oko 90% sličnosti u sekvenci) i visokog stupnja sličnosti proteinske strukture ove dvije izoforme proizlazi njihova ista uloga u biosintezi prostaglandina. Međutim, razlikuju se

u strukturi aktivnih mjesta i mehanizmu njihovog djelovanja što doprinosi različitoj aktivnosti COX-1 i COX-2 te specifičnim ulogama u pojedinim tkivima (Smith i sur., 2000; Catela Ivković, 2010). Gen COX-1 koji kodira za izoformu COX-1 smješten je na duljem kraku kromosoma 9, dug je ~22kb i sadrži 11 eksona i 10 introna (Yokoyama i Tanabe, 1989; Funk i sur., 1991), dok je gen COX-2 smješten na duljem kraku kromosoma 1, dug je ~8kb i ima 10 eksona i 9 introna (slika 2).



Slika 2. Struktura gena COX-1 i COX-2 (brojevima su označeni egzoni) (Catela Ivković, 2014)

COX-1 se konstitutivno eksprimira u mnogim tkivima, osobito u trombocitima, endotelnim stanicama, gastrointestinalnom traktu, glomerulima, itd. te ima važnu ulogu u kontroli homeostaze (Dubois i sur., 1998). Konstitutivna aktivnost COX-1 katalizira nastajanje prostaglandina koji su uključeni u brojne fiziološke funkcije, uključujući održavanje normalne funkcije bubrega i zaštitu sluznice u gastrointestinalnom traktu (Rao i sur., 2008). Nasuprot tome, COX-2 je dominantno inducibilni enzim, iako postoji niska konstitutivna ekspresija u bubrezima, mozgu, kostima, ženskom reproduktivnom sustavu i gastrointestinalnom traktu. Aktivira se kao odgovor na izvanstanične podražaje kao što su djelovanje faktora rasta i proupalnih citokina (Simmons i sur., 2004) te je COX-2 ekspresija potaknuta u mnogim tkivima tijekom upale, zacjeljivanja rana i nastanka novotvorevina. Stoga je protuupalna aktivnost NSAID-ova posljedica inhibicije COX-2, dok su neželjene nuspojave kao što je iritacija mukoze želuca posljedica inhibicije aktivnosti konstitutivnog enzima COX-1.

2.3. Klasifikacija NSAID-ova

NSAID-ovi se mogu kategorizirati prema brojnim karakteristikama, uključujući COX selektivnost te kemijska i farmakološka svojstva (tablica 1). Općenito su kemijski slični po tome što su NSAID-i liposolubilne slabe kiseline, no postoje neke klinički značajne razlike u njihovim farmakokinetičkim svojstvima. NSAID-ovi obično imaju visoku biodostupnost nakon oralne primjene i dobru apsorpciju iz gastrointestinalnog trakta. Međutim, stopa apsorpcije razlikuje se među NSAID-ovima, o čemu ovisi primjerenost različitih NSAID-ova za pojedine namjene (Day i sur., 1988). Brza apsorpcija je poželjna značajka za pacijente koji koriste NSAID za trenutačno analgetsko olakšanje boli, ali ti ne moraju biti prikladni za bolesnike s kroničnom boli. NSAID-ovi se također kategoriziraju prema vremenu poluživota u dvije skupine: one s kratkim poluživotom (< 6 sati) i one s dugim poluživotom (> 6 sati). O podjeli obzirom na vrijeme poluživota ovisi doziranje lijeka pa se tako npr. ibuprofen općenito primjenjuje svakih 6-8 sati dok se NSAID-ovi s duljim poluživotom (npr. naproksen i celekoksib) primjenjuju jednom ili dva puta dnevno (Conaghan, 2012).

Tablica 1. Kemijska i farmakološka svojstva NSAID-ova

NSAID	COX-2 selektivnost	Biodostupnost (%)	Vrijeme poluživota (sati)	C _{max} (sati)	Izlučivanje bubregom (%)	Izlučivanje fecesom (%)	Kemijska struktura	Klinička doza (mg dan ⁻¹)
Celekoksib	Selektivni	22-40	11	3	27	57	Fenamat	200
Diklofenak	Neselektivni	50-60	2	2	65	0	Derivat acetatne kis.	100-150
Etodolak	Neselektivni	≥80	7.3	1.5	72	16	Indol	50-100
Fenoprofen	Neselektivni	/	3	2	90	0	Derivat propionske kis.	800-2400
Flurbiprofen	Neselektivni	/	5.7	1.5	>70	0	Derivat propionske kis.	100-300
Ibuprofen	Neselektivni	≥80	1.8-2	1-2	45-79	0	Derivat propionske kis.	1200-3200
Indometacin	Neselektivni	98	4.5	2	60	33	Indol	600-1200
Ketoprofen	Neselektivni	90	2.1	0.5-2	80	0	Derivat propionske kis.	200-300
Ketoprofen ER	Neselektivni	90	5.4	6-7	80	0	Derivat propionske kis.	200-300
Ketorolak	Neselektivni	100	5-6	2-3	91	6	Indol	120
Mefenamatna kiselina	Neselektivni	/	2	2-4	52	20	Fenamat	1000
Meklofenamat	Neselektivni	100	1.3	0.5-2	70	30	Fenamat	200-400
Meloksikam	Selektivni	89	15-20	4-5	50	50	Oksikam	7.5-15
Nabumeton	Neselektivni	≥80	22.5	9-12	80	9	Naftilalkanon	1000-2000
Naproksen	Neselektivni	95	12-17	2-4	95	0	Derivat propionske kis.	500-1000
Oksaprozin	Neselektivni	95	42-50	3-5	65	35	Indol	600-1200
Piroksikam	Neselektivni	/	50	3-5	/	/	Oksikam	20
Rofekoksib	Selektivni	93	17	2-3	72	14	Koksib	25
Sulindak	Neselektivni	90	7.8	2-4	50	25	Indol	300
Tolmetin	Neselektivni	/	2-7	0.5-1	100	0	Indol	800-1600
Valdekoksib	Selektivni	83	8-11	3	90	<5	Koksib	10-40

2.4. Toksičnost NSAID-ova

Kao i mnogi drugi lijekovi, primjena NSAID-a ima niz neželjenih nuspojava, uključujući bubrežnu toksičnost, hipertenziju, zadržavanje tekućine, kardiovaskularne i gastrointestinalne komplikacije (Jones, 2001), pri čemu se npr. endoskopski ulkus javlja u 10-30% pacijenata koji koriste te lijekove, dok su ozbiljnije komplikacije zabilježene kod 1-2% pacijenata (Laine, 1996; Silverstein i sur., 1995). Suvremene preporuke u razvoju te skupine lijekova usmjerene su k smanjenju toksičnosti NSAID-a te se naglašava važnost odabira odgovarajućeg NSAID-a prilikom propisivanja terapije obzirom na rizične faktore kod svakog pojedinačnog pacijenta. Većina studija u kojima je ispitivana gastrointestinalna sigurnost NSAID-ova ukazala je da su COX-2 selektivni inhibitori povezani s nižim rizikom od čira i komplikacija gastrointestinalnog sustava nego neselektivni NSAID-i (Singh i sur., 2006; Silverstein i sur., 2000), međutim povećana selektivnost prema COX-2 se povezuje s povećanim rizikom od kardiovaskularne toksičnosti (Warner i Mitchell, 2008).

2.5. Antikancerogeno djelovanje NSAID-a

Brojne eksperimentalne, epidemiološke i kliničke studije upućuju na to da nesteroidni protuupalni lijekovi, posebice visoko-selektivni inhibitori COX-2, imaju veliki potencijal za primjenu kao antikancerogeni lijekovi. Prva naznaka da NSAID-ovi mogu inhibirati pojavu i/ili napredak kolorektalnog karcinoma datira iz sredine 1970-ih kada su Bennett i Del Tacca te Jaffe objavili da je koncentracija prostaglandina E_2 veća u ljudskom kolorektalnom tumorskom tkivu nego u okolnoj normalnoj sluznici (Bennet i Del Tacca, 1975; Jaffe, 1974). Ova zapažanja potaknula su brojna istraživanja u kojima je pokazano da različiti NSAID-ovi štite od kemijski induciranog raka debelog crijeva ili stvaranja neoplastičnih lezija kod štakora ili miševa. NSAID-ovi djeluju na mehanizme koji pomažu suzbiti malignu transformaciju i rast tumora poticanjem apoptoze te sprječavanjem angiogeneze kod ljudskih adenomatoznih kolorektalnih polipa, eksperimentalnih tumora debelog crijeva, te u različitim staničnim linijama raka. Epidemiološke studije pokazale su da je dugotrajna upotreba NSAID-ova povezana s nižim rizikom od raka debelog crijeva i adenomatoznih polipa te nekih drugih karcinoma. Obzirom da aktivnost COX-2 i sinteza prostaglandina doprinose razvoju tumora putem višestrukih mehanizama, a NSAID-ovi djeluju na inhibiciju COX-a, time zapravo indirektno djeluju na signalne molekule uključene u te mehanizme i inhibiraju

tumorigenezu. U nastavku slijedi kratki opis molekularnih mehanizama na kojima se temelji NSAID-ima potaknuta inhibicija tumora.

2.5.1. Inhibicija COX-2 i antitumorska aktivnost

Prema do sada dostupnoj literaturi NSAID-ovi djeluju na smanjenje rizika karcinogeneze debelog crijeva putem inhibicije pretvorbe arahidonske kiseline djelovanjem COX enzima, koji sudjeluju u sintezi prostaglandina, koji pak utječu na proliferaciju stanica, rast tumora i imunosnu reakciju (Marnett, 1992; Smith i sur., 2000). Istraživanja su također pokazala da je prekomjerna ekspresija COX-2 često prisutna u mnogim vrstama raka, uključujući debelo crijevo, pluća, dojke, gušteraču, vrat i glavu (Hwang i sur., 1998; Okami i sur., 1999; Tucker i sur., 1999; Hida i sur., 1998; Cohen i sur., 2003), a obično je povezan s lošom prognozom i kratkim preživljavanjem. *In vitro* istraživanjem na epitelnim stanicama koje prekomjerno ekspimiraju COX-2 gen utvrđeno je da razvijaju adhezijska svojstva i otpornost na apoptozu (Tsujii i sur., 1995) te je zaključeno da prekomjerna ekspresija COX-2 može promijeniti proliferacijski kapacitet i tumorigeni potencijal epitelnih stanica. Pretpostavlja se da je nekoliko mehanizama koji rezultiraju protumorskom aktivnošću COX-2. Prvi mehanizam obuhvaća prostaglandine, metabolite COX-2, koji su promotori rasta i mogu izravno stimulirati proliferaciju stanica raka (Pai i sur., 2002; Mutoh i sur., 2002). Nadalje, prostaglandini mogu djelovati i kao antiapoptotičke molekule koje mogu spriječiti apoptozu induciranu antitumorskim lijekovima (Lin i sur., 2001; Sorokin, 2004), a također su i imunoregulacijske molekule za koje je dokazano da potiskuju antitumorsku aktivnost prirodnih stanica ubojica i makrofaga (Huang i sur., 1996). Zatim, dokazano je da COX-2 angiogeni stimulator koji povećava proizvodnju angiogenih faktora i migraciju endotelnih stanica što također pridonosi razvoju tumora (Tsujii i sur., 1998; Gately, 2000). Konačno, ekspresija COX-2 može povećati invazivnu sposobnost tumorskih stanica što rezultira metastazama (Dermond i Ruegg, 2001; Costa i sur., 2002).

2.5.2. Suzbijanje proliferacije inhibicijom staničnog ciklusa

NSAID-ovi dokazano smanjuju ekspresiju ili djeluju na aktivnost promotora staničnog ciklusa. Primjerice, neki od njih inhibiraju ekspresiju ciklina D1, A i B te enzimske aktivnosti ciklina E/ciklin-ovisne kinaze 2 (CDK2) i ciklina B1/CDK1 što posljedično dovodi do zaustavljanja rasta *in vitro* i regresije tumora *in vivo* (Kardosh i sur., 2004; Narayanan i sur., 2003; Grosch i sur., 2001; Maier i sur., 2004). NSAID-ovi također mogu djelovati na smanjenu proliferaciju stanica povećavanjem ekspresije negativnih regulatora staničnog ciklusa, kao što su p21Waf1 i p27Kip1 (Kardosh i sur., 2004; Hung i sur., 2000).

2.5.3. Indukcija apoptoze

Učinak NSAID-ova na vitalnost stanica ovisi o vrsti lijeka i tipu stanica. Tako naprimjer COX-2 inhibitor celekoksib učinkovito potiče apoptozu stanica raka debelog crijeva, kolangiokarcinoma i stanica raka prostate (Nam i sur., 2004; Wun i sur., 2004; Dandekar i sur., 2005), dok COX-2 selektivni inhibitor NS398 ne inducira apoptozu u stanicama karcinoma pluća (Huang i sur., 2002), a rofekoksib pokazuje malu citotoksičnost *in vitro* (Waskewich i sur., 2002). Također dokazano je da sposobnost NSAID-ova da potaknu apoptozu tumorskih stanica ovisi o uvjetima kulture, pri čemu je zapaženo da su stanice koje se uzgajaju pri niskoj koncentraciji seruma osjetljivije na djelovanje NSAID-a (Chang i Weng, 2001). Molekule koje se povezuju sa sposobnošću NSAID-ova da izazovu apoptozu uključuju obitelj bcl-2 gena, survivin, Mcl-1, kaspaze i medijatore poput ceramida i AKT kinaze (Jazirehi i Bonavida, 2004; Kern i sur., 2002; Kundu i sur., 2002).

2.5.4. Represija angiogeneze

Stanični proces pomoću kojeg inhibitori COX-2, odnosno određeni NSAID-ovi, također mogu inhibirati rast tumora su inhibicija angiogeneze i neovaskularizacije. Najmoćniji angiogeni faktor rasta je vaskularni endotelijski faktor rasta (VEGF). Prekomjerna ekspresija COX-2 dovodi do povećane proizvodnje eikozanoida, kao što su prostaglandini i

tromboksani, koji mogu potaknuti ekspresiju VEGF te tako stimulirati angiogenezu tumora (Li i sur., 2002). Stoga, inhibicija aktivnosti COX-2, npr. celekoksibom, smanjuje angiogenezu i rast tumora *in vivo*. Prema rezultatima istraživanja na miševima i štakorima, dokazano je da selektivni inhibitori COX-2 suprimiraju rast kapilarnih krvnih žila rožnice u štakora izloženim bazičnom faktoru rasta fibroblasta i inhibiraju rast nekoliko tipova ljudskih tumora transplantiranih u miševima (Gately i sur., 2004).

2.6. *In vitro* ispitivanje citotoksičnosti primjenom kulture životinjskih stanica

Primjena kultura životinjskih stanica vrlo je raznolika te uključuje brojna područja znanosti. U svakodnevnom znanstveno-istraživačkom radu najčešće se koriste kontinuirane stanične linije dobivene subkultiviranjem primarne kulture. Koriste se u biotehnologiji kao proizvodne stanične linije, u područjima genetičkog i tkivnog inženjerstva, u staničnoj i molekularnoj biologiji, fiziologiji te imunologiji. Također, imaju značajnu ulogu u farmakologiji za ispitivanje djelovanja i metabolizma lijekova te u toksikologiji za ispitivanje citotoksičnosti.

Uporaba *in vitro* sustava obuhvaća primjenu staničnih frakcija, staničnih linija, primarne stanične kulture, dijelova tkiva, kulture organa, itd., a koriste se kao alternativa klasičnim *in vivo* testovima na pokusnim životinjama (Kniewald i sur., 2005). Imaju široku primjenu u toksikološkim istraživanjima te se najčešće rabe u istraživanjima molekularnih, staničnih i fizioloških mehanizama toksičnosti izazvanih kemikalijama. Interakcija ispitivane tvari i bioloških sustava javlja se ponajprije na staničnoj razini, što je činjenica na kojoj se temelji primjena *in vitro* kultura stanica. Općenito, pomoću *in vitro* testova određuje se bazalna citotoksičnost koja se definira kao učinak nastao međudjelovanjem ispitivane tvari i/ili procesa neophodnih za preživljavanje, proliferaciju ili funkcije zajedničke svim stanicama u organizmu (Ekwall, 1995). Stoga, rezultati dobiveni *in vitro* testovima mogu poslužiti kao smjernice za daljnje planiranje *in vivo* ispitivanja. Razumijevanje mehanizama kojima kemikalije uzrokuju oštećenje stanica i tkiva te povećanu osjetljivost pojedinih vrsta ili pojedinaca ili tkiva na određene kemikalije, značajno pridonose predviđanju mogućih posljedica izloženosti ljudi i/ili okoliša tim kemikalijama. Osim navedenog, prednostima primjene *in vitro* testova toksičnosti smatraju se visok stupanj standardizacije i reproducibilnosti, niža cijena od *in vivo* testova, rutinska i relativno brza provedba, manja količina toksičnog otpada te mogućnost simultanog i/ili ponovljenog uzimanja uzoraka, čime

se smanjuje broj pokusnih životinja potrebnih za *in vivo* testiranja. S druge strane, nedostaci *in vitro* testova su mogućnost reakcije ispitivane tvari sa sastojcima medija za uzgoj te činjenica da kontinuirane stanične linije u *in vitro* uvjetima imaju izmijenjena svojstva i metaboličku aktivnost zbog čega kemikalije u takvim sustavima mogu iskazati drugačije djelovanje nego u živom organizmu. Usprkos tome, dokazana je relativno dobra podudarnost za oko 80% rezultata istraživanja toksičnosti provedenih primjenom *in vitro* i *in vivo* testova (Fent, 2001).

Alternativni *in vitro* testovi u kulturama stanica imaju široku upotrebu i mogu se koristiti za ispitivanje citotoksičnosti, odnosno antitumorskog potencijala lijeka u predkliničkoj fazi ili za određivanje biološke aktivnosti potencijalno aktivnih tvari. Nacionalni institut za rak (eng. *National Cancer Institute*, NCI) 1990.g. predložio je primjenu tzv. primarnog *in vitro* testa koji uključuje listu 60 najvažnijih humanih tumorskih staničnih linija za testiranje različitih tvari u definiranim rasponima koncentracija (Boyd i Paull, 1995). Cilj takvog pristupa je ustanoviti relativni stupanj inhibicije rasta ili citotoksičnosti za svaku staničnu liniju stoga takvi testovi služe za odabir spojeva koji imaju potencijal kao antitumorski lijekovi za daljnja *in vivo* istraživanja. Također, primjenom *in vitro* testova moguće je pretpostaviti mehanizam djelovanja ispitivanog spoja (Covell i sur., 2007).

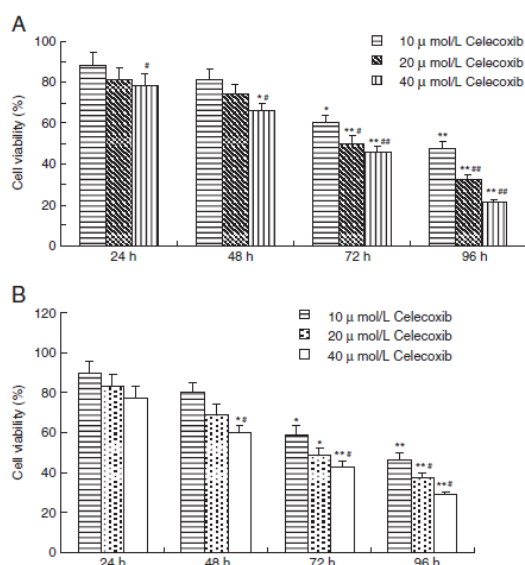
U *in vitro* testovima citotoksičnosti i/ili određivanja biološke aktivnosti spojeva najčešće se koriste razne stanične linije sisavaca, uključujući humane, te stanične linije riba. Izvor staničnih linija za potrebe znanstvenih istraživanja najčešće su *American Type Culture Collection* (ATCC) i *The European Collection of Animal Cell Culture* (ECACC), dvije najveće kolekcije stanica s preko 3000 staničnih linija.

2.6.1. Pregled *in vitro* ispitivanja antitumorske aktivnosti NSAID-a primjenom kultura stanica

Niz istraživanja na staničnim linijama ukazuju na potencijal NSAID-ova kao efikasnih antitumorskih agenasa.

Prema studiji Dai i suradnika (2012) celekoksib inhibira *in vitro* proliferaciju dvije stanične linije raka dojke, MCF-7 i MDA-MB-231, prevenira pojavu kemijski induciranog raka dojke u štakorima stoga se smatra efikasnim lijekom u antitumorskoj terapiji. Stanice su tretirane

različitim koncentracijama navedenog lijeka te je utvrđen stupanj inhibicije proliferacije stanica raka ovisan o dozi te vremenu izloženosti (slika 3).



Slika 3. Inhibicija rasta MCF-7(A) i MDA-MB-231(B) celekoksibom u ovisnosti o vremenu i različitim koncentracijama lijeka (Dai i sur., 2012)

U drugoj studiji, ispitivan je antitumorski učinak te mehanizam djelovanja ibuprofena, flurbiprofena, indometacina, mefenamatne kiseline, diklofenaka i sulindak sulfona u staničnoj liniji raka debelog crijeva, HT29. Rezultati su pokazali da svi lijekovi imaju malu do srednju antitumorsku aktivnost, dok je flurbiprofen najpotentniji te inducira ekspresiju enzima koji sudjeluje u katabolizmu prostaglandina i na taj način sprječava proliferaciju stanica raka (Chi i sur., 2009).

In vitro citotoksičnost celekoksiba, sulindaka, nimesulida, deksametazona, mefenamatne kiseline, flufenamatne kiseline i meklofenamatne kiseline ispitivana je na staničnim linijama raka grlića maternice: HeLa, VIPA, INBL i SiHa. Ustvrđeno je da navedeni NSAID-ovi imaju slabo do umjereno toksično djelovanje (10-40% smrtnost stanica), dok meklofenamatna kiselina pokazuje značajnu citotoksičnost na svim testiranim staničnim linijama (50-90% smrtnost stanica). Na temelju tih rezultata provedena su *in vivo* istraživanja na miševima koji su tretirani meklofenamatnom kiselinom i kod kojih je zapažena redukcija veličine tumora te povećano preživljenje miševa (Soriano-Hernandez i sur., 2015).

Provedeno je i istraživanje mefenamatne kiseline i njenih metalnih kompleksa obzirom na njihovu *in vitro* antiproliferacijsku aktivnost na tri stanične linije raka: MCF-7, T24

(stanična linija raka mokraćnog mjehura) i A-549 (stanična linija raka pluća) te na staničnoj liniji mišjih fibroblasta, L-929. Prema izračunatim IC_{50} vrijednostima, kompleks mefenamatne kiseline s Cu(II) ima važno biološko djelovanje zbog toga što u odnosu na IC_{50} vrijednost cisplatine, poznatog kemoterapeutika, ima slična ili bolja antiproliferacijska svojstva (Kovala-Demertzi, 2009).

2.6.2. *In vitro* i *in vivo* učinak NSAID-ova na kolorektalni karcinom

NSAID-ovi kao protuupalni lijekovi mogu imati pozitivan zaštitni učinak kod osoba s predispozicijom prema razvoju različitih oblika karcinoma. Najviše istraživanja je provedeno s ciljem ispitivanja djelovanja NSAID-ova kod obiteljske adenomatozne polipoze (eng. *Familial Adenomatous Polyposis*, FAP) vezano za sklonost obolijevanju od karcinoma debelog crijeva. Terapija celekoksibom pokazala je značajno smanjenje broja polipa i adenoma (Steinbach i sur., 2000; Arber i sur., 2006; Bertagnolli i sur., 2006), a sličan učinak imao je i rofekoksib (Baron i sur., 2006). Unatoč brojnim kliničkim istraživanjima COX-2 selektivnih inhibitora, jedino je celekoksib odobren za upotrebu od strane Američke agencije za hranu i lijekove (FDA), dok su rofekoksib i valdekoksib povučeni zbog jakih nuspojava izazvanih dugotrajnim korištenjem. Apoptoza ili programirana stanična smrt, potrebna je za održavanje homeostaze u tkivima koja se konstantno repliciraju, kao što je tkivo crijeva. Djelomično suzbijanje apoptoze javlja se u ranom stadiju tumorogeneze kod približno 85% ljudskih kolorektalnih karcinoma zbog inaktivacije oba alela gena adenomatozna polipoza debelog crijeva (eng. *adenomatous polyposis coli*, APC) (Morris i sur., 1996; Kinzler i sur., 1998), a daljnja supresija nastaje kada se u stanicama nakupe dodatne genetske mutacije i dogode fenotipske promjene. Iako molekularni mehanizmi kojima NSAID-ovi inhibiraju kolorektalnu neoplaziju nisu u potpunosti razjašnjeni, postoji sve više dokaza da je inhibicija tumora djelovanjem NSAID-a vezana s njihovom sposobnošću da potaknu apoptozu u tumorskim stanicama s nedostatkom APC gena (He i sur., 1999) te njihovu sposobnost da inhibiraju angiogenezu. Prema rezultatima epidemioloških studija, postoji veza između uzimanja aspirina i smanjenog rizika od razvitka karcinoma debelog crijeva (Thun i sur., 1991). Sulindak uzrokuje redukciju sinteze prostaglandina te regresiju adenomatoznih polipa kod 11 od 15 pacijenata s nasljednim adenomatoznim polipima, stanjem u kojem mnogi kolorektalni polipi spontano prijeđu u tumore. Svakodnevna upotreba NSAID-a povezana je sa smanjenjem razvitka adenomatoznih polipa te smanjenjem smrtnosti od raka debelog crijeva za čak 30% -50% (Paganini-Hill i sur., 1989). U *in vitro* uvjetima, selektivni inhibitori

COX-2 i neselektivni NSAID-ovi potiču apoptozu u stanicama s inaktivnim genom adenomatozna polipoza debelog crijeva, koje još nisu podvrgnute malignoj transformaciji, dok samo selektivni NSAID-ovi imaju sposobnost inhibicije kemijski induciranih tumora kada polipi prođu malignu transformaciju. Prema rezultatima niza istraživanja, selektivni inhibitori COX-2 potiču apoptozu i suzbijaju rast mnogih karcinoma, uključujući studije kultiviranog ljudskog karcinoma želuca, jednjaka, jezika, mozga, pluća, gušterače, dojke, prostate i jajnika (Thun i sur., 2002). Točan mehanizam kojim NSAID-ovi induciraju apoptozu tumorskih stanica koje su izgubile tu sposobnost još nije sasvim razjašnjen, premda je jasno da utječe na čimbenike povezane s nedostatkom gena adenomatozna polipoza debelog crijeva ili indukciju COX-2 ili oboje. Tvrdnju da je aktivnost COX uključena u proces razvitka karcinoma debelog crijeva potkrijepili su i rezultati istraživanja da je razina COX-2 visoko eksprimirana u stanicama raka debelog crijeva kod ljudi i životinja kao i kod ljudskih kolorektalnih adenoma što ukazuje na njegovu ulogu u ranim stadijima karcinogeneze (Kutchera i sur., 1996), dok je razina COX-1 u tumorskom tkivu nepromijenjena ili je neznatno snižena u odnosu na normalnu sluznicu debelog crijeva. U studiji na *Apc* mutantima miševa, koji su modeli za obiteljsku adenomatoznu polipozu kod ljudi, razvoj intestinalnih polipa značajno je reduciran ili delecijom gena za COX-2 ili tretmanom visokoselektivnim COX-2 inhibitorom (Sheng i sur., 1997).

3. EKSPERIMENTALNI DIO

3.1. MATERIJALI

3.1.1. Otopine NSAID-ova

Ishodne otopine NSAID-ova otopljenih u metanolu u 500 ppm (0,5 mg mL⁻¹) i 1000 ppm (1 mg mL⁻¹) koncentracijama dobivene su od Hrvatskog veterinarskog instituta u Zagrebu (tablica 2).

Tablica 2. Popis NSAID-ova korištenih u ovom radu

NSAID	Skraćenica	c (ppm)
ANTIPIRIN	A	1000 ppm
4-AMINOANTIPIRIN	AA	1000 ppm
KARPROFEN	CPF	1000 ppm
DIKLOFENAK	DC	1000 ppm
FLUFENAMATNA KISELINA	FFA	1000 ppm
NAPROKSEN	NP	1000 ppm
NIFLUMANATNA KISELINA	NFA	1000 ppm
OKSIFENBUTAZON	OPB	1000 ppm
FLUNIKSIN	FLU	1000 ppm
5-HIDROKSI FLUNIKSIN	FLUOH	1000 ppm
4-HIDROKSiantiPIRIN	OH-A	1000 ppm
IBUPROFEN	IBP	1000 ppm
KETOPROFEN	KTP	1000 ppm
MEKLOFENAMATNA KISELINA	MCA	1000 ppm
MEFENAMATNA KISELINA	MFA	1000 ppm
MELOKSIKAM	MLX	1000 ppm
PIROKSIKAM	PRX	1000 ppm
SALICILATNA KISELINA	SA	1000 ppm
TOLFENAMATNA KISELINA	TFA	1000 ppm
VEDAPROFEN	VDP	500 ppm
FIROKOKSIB	FCX	500 ppm
ISOPROPILAMINOANTIPIREN (sinonim RAMIFENAZON)	IPAA/RAM	500 ppm
4-METILAMINOANTIPIRIN	MAA	500 ppm
4-FORMILAMINOANTIPIRIN	FAA	500 ppm
FENILBUTAZON	PBZ	500 ppm

3.1.2. Kemikalije

0,25% Trypsin-EDTA, GIBCO Invitrogen Corporation, Paisley, Velika Britanija

Dinatrijev hidrogenfosfat, Kemika, Zagreb, RH

DMEM (*Dulbecco's Modified Eagle's Medium*), GIBCO Invitrogen Corporation, Paisley, Velika Britanija

Etanol, Kemika, Zagreb, RH

FBS (*Fetal Bovine Serum*), GIBCO Invitrogen Corporation, Auckland, Novi Zeland

Kalijev dihidrogenfosfat, Kemika, Zagreb, RH

Kalijev klorid, Kemika, Zagreb, RH

Metanol, Kemika, Zagreb, RH

CellTiter 96[®] AQueous One Solution Cell Proliferation Assay (MTS test), Promega Corporation, Madison, WI, SAD

Muse[™] Annexin V & Dead Cell Kit, Merck KGaA, Darmstadt, Njemačka

Muse[™] Cell Cycle Kit, Merck KGaA, Darmstadt, Njemačka

Natrijev klorid, Kemika, Zagreb, RH

Tripan-plavo, Sigma-Aldrich, St.Louis, SAD

3.1.3. Otopine i puferi

PBS pufer (pH=7,4):

Natrijev klorid	8,0 g
-----------------	-------

Kalijev klorid	0,2 g
----------------	-------

Dinatrijev hidrogenfosfat	1,44 g
---------------------------	--------

Kalijev dihidrogenfosfat	0,24 g
--------------------------	--------

Destilirana voda do 1000 mL

0,4 % otopina tripan-plavo:

Boja tripan-plavo 0,08g

PBS pufer 20,00 mL

3.1.4. Humane stanične linije

U ovom radu korištene su četiri humane stanične linije, od toga su tri tumorske, HeLa, HepG2 i MCF-7 te jedna normalna, HEK293T, dobivene iz *American Type Culture Collection* (ATCC) radne banke stanica.

Prva i najčešće korištena humana stanična linija, HeLa, čiji naziv potječe od pacijentice Henriette Lacks, izolirana je i uspostavljena 1952.g. iz tumora grlića maternice. HepG2 je stanična linija humanog karcinoma jetre izolirana iz pacijenta s uznapredovalim hepatocelularnim karcinomom. MCF-7 je stanična linija tumora dojke, uspostavljena 1973.g. na institutu u Detroitu, Michigan Cancer Foundation-7, prema kojem je i dobila ime. HEK293T stanična linija dobivena je transfekcijom HEK293 stanične linije u laboratoriju na Stanfordu, a izvorno potječu iz humanih embrionalnih stanica bubrega. Korištene stanične linije su morfološki epitelne stanice adherentnog tipa koje rastu u monosloju.

Sve stanične linije su održavane i uzgajane u inkubatoru s kontroliranom atmosferom od 95% zraka i 5% CO₂, pri temperaturi 37 °C, u Petrijevim zdjelicama za kultivaciju životinjskih stanica. Stanice su održavane u eksponencionalnoj fazi rasta te korištene za postavljanje pojedinačnih pokusa u pločama s jažicama. Medij koji je korišten za uzgoj stanica je DMEM, uz dodatak 10 % (v/v) FBS.

3.1.5. Uređaji i oprema

Čitač ploča, Tecan Sunrise, Mannedorf, Švicarska

Dyno-Eye digital camera, ANMO Electronics Corporation, Tajvan

Hladnjak (4 °C i -20 °C), Gorenje, Slovenija

Inkubator s kontroliranom atmosferom CO₂, Kambič, Slovenija

Inverzni mikroskop, Carl Zeiss, Njemačka

Komora za sterilni rad, Iskra PIO, Slovenija

Laboratorijska centrifuga, Hettich Zentrifugen, ROTOFIX 32, Tuttlingen, Njemačka

Muse™ Cell Analyzer (Analizator staničnog zdravlja), EMD Milipore Corporation, Massachusetts, SAD

Neubauer-ova komorica za brojanje stanica, Reichert Bright-Line, Buffalo, NY, SAD

Petrijeve posude za uzgoj stanica, Thermo Scientific BioLite, SAD

Ploče s 6 i 96 jažica, Corning, SAD

Svjetlosni mikroskop Axiostar 1122-100, Carl Zeiss, Njemačka

T-boce od 25 cm², Corning, SAD

3.2. METODE

3.2.1. Uzgoj stanica

Uzgoj započinje odmrzavanjem stanica u koncentraciji od oko 1×10^7 stanica mL^{-1} u ampulama od 1 mL, koje se čuvaju zamrznute na $-80\text{ }^{\circ}\text{C}$ u mediju za zamrzavanje, naglim uranjanjem u vodenu kupelj, na $37\text{ }^{\circ}\text{C}$. Zatim se stanice centrifugiraju pri 1000 okretaja min^{-1} tijekom 3 minute i ukloni supernatant, a talog stanica se resuspendira u DMEM mediju za uzgoj koji sadrži 10% FBS. Stanice se prebace u T-bocu ili Petrijevu zdjelicu koja se stavlja u inkubator na odgovarajuću temperaturu uz atmosferu s 95% zraka i 5% CO_2 . Morfologija stanica, njihovo opće stanje i brojnost provjerava se pod inverznim mikroskopom te se precjepljuju kada je pokrivenost površine oko 80% kako bi se održavale u eksponencijalnoj fazi rasta. Tijekom uzgoja se također prati i boja medija, jer nagla promjena boje često ukazuje na pojavu kontaminacije u kulturi.

3.2.2. Određivanje broja stanica metodom tripan-plavo i tretman NSAID-ovima

Za utvrđivanje broja živih stanica korištena je metoda tripan-plavo (0,4% m/v). Iz Petrijeve zdjelice u kojoj se uzgaja i održava biomasa stanica, ukloni se hranjivi medij, a površina za uzgoj ispere sterilnim PBS puferom. Zatim se doda 1 mL tripsina i posuda sa stanicama se stavlja natrag u inkubator na oko 5 minuta kako bi se one djelovanjem tripsina odvojile od površine za uzgoj. Stanice se zaokruže kada se odvoje od podloge, a uspješnost odvajanja pratimo inverznim mikroskopom. Odvojenim stanicama dodajemo 1 mL kompletnog medija (DMEM + 10 % FBS) za inaktivaciju tripsina, stanice se resuspendiraju te se alikvot suspenzije stanica (20 μL) pomiješa s 20 μL boje tripan-plavo. Zatim se 20 μL tako pripremljene suspenzije stanica nanese u Neubauer-ovu komoricu za brojanje. Mrtve stanice će se obojati u plavo zbog oštećene membrane koja je propusna, te ih tako razlikujemo od živih stanica, koje aktivno izbacuju boju te ostaju neobojene. Za svaki uzorak izračuna se broj stanica po mL suspenzije stanica prema izrazu:

$$\text{Broj stanica mL}^{-1} \text{ suspenzije} = \text{zbroj stanica u 4 kvadrata} \times 5000 \quad (1)$$

Nakon određivanja ukupnog broja stanica izračuna se volumen suspenzije stanica koji je potreban za naciepljivanje ploče s 96 jažica za svaku staničnu liniju u željenoj početnoj koncentraciju stanica. U svaku jažicu naciepi se po 100 μL suspenzije stanica, pri čemu su HepG2, MCF-7 i HeLa stanice naciepljivane u početnoj koncentraciji od 5×10^4 stanica mL^{-1} , a HEK293T stanice 3×10^4 stanica mL^{-1} . Nakon 24 sata, kada su se stanice prihvatile za podlogu, tretirane su različitim volumenima ishodnih otopina NSAID-ova kako bi nominalne koncentracije ispitivanih tvari u jažici bile: 10 μM , 50 μM , 100 μM i 200 μM , pri čemu su za svaku koncentraciju postavljene po 4 paralele. Nakon 72 sata MTS metodom određena je vijabilnost, odnosno preživljenje stanica i izražena kao postotak preživljenja tretiranih stanica u odnosu na netretirane kontrolne stanice.

3.2.3. Određivanje preživljenja stanica MTS metodom

CellTiter 96[®] AQueous One Solution Cell Proliferation test ili skraćeno MTS test je *in vitro* kolorimetrijska metoda koja se najčešće koristi za kvantitativno određivanje živih stanica u proliferacijskim testovima ili testovima citotoksičnosti. Princip testa se temelji na klasičnoj MTT metodi, no danas se koriste razne modifikacije te metode u kojima su supstrati za djelovanje mitohondrijskih dehidrogenaza tetrazolijeve soli (MTS, WST-1, XTT, itd.) koje se metaboliziraju u topivi produkt te nije potreban korak otapanja kristala formazana s organskim otapalom dimetilsulfoksidom. CellTiter 96[®] AQueous One Solution Cell Proliferation test se temelji na bioredukciji nove tetrazolijeve soli 3-(4,5-dimetiltiazol-2-il)-5-(3-karboksimetoksifenil)-2-(4-sulfofenil)-2H-tetrazolij (MTS) u smeđi produkt formazan koji je topiv u mediju za uzgoj stanica što ovaj test čini bržim i jednostavnijim za korištenje od originalnog MTT testa. Količina nastalog formazana, odnosno obojenja, određuje se mjerenjem apsorbancije uzorka pri 490 nm, a izmjerena apsorbancija direktno je proporcionalna broju živih stanica u uzorku.

Određivanje preživljenja stanica MTS metodom provedeno je sukladno uputama proizvođača s manjim izmjenama. Ukratko, stanicama koje su tretirane različitim koncentracijama NSAID-ova, ukloni se medij s lijekovima te se doda svježi DMEM s MTS reagensom (10 μL MTS reagensu u 100 μL medija za uzgoj). Ploča sa stanicama se zatim vrati u inkubator narednih 3-4 sata, ovisno o staničnoj liniji. Nakon završetka inkubacije intenzitet razvijene boje određuje se spektrofotometrijski pomoću čitača ploča pri 490 nm.

Postotak preživljenja stanica izračunat je kao omjer apsorbancije tretiranih i netretiranih (kontrolnih) stanica prema izrazu:

$$\text{Preživljenje stanica (\%)} = \left[\frac{\text{srednja vrijednost A490(uzorka)}}{\text{srednja vrijednost A490 (kontrola)}} \right] \times 100 \quad (2)$$

Sva mjerenja citotoksičnosti NSAID-ova provedena su sa po četiri paralele za svaku koncentraciju, a svako mjerenje je ponovljeno dva puta. Prikazani rezultati su prosječne vrijednosti dvaju mjerenja te su iskazana zajedno sa standardnom devijacijom (\pm S.D.).

Ako je u ispitanoj rasponu koncentracija, pri određivanju preživljenja stanica, odnosno, citotoksičnog učinka NSAID-ova postignuta 50%-tna inhibicija rasta stanica, eksperimentalni podatci su aproksimirani krivuljom koja ih najbolje opisuje. Regresijskom analizom odabrana je ona krivulja koja najmanje odstupa od eksperimentalnih podataka tj. ona čija je vrijednost koeficijenta determinacije R^2 bliža 1 ($R^2 \sim 1$). Rješavanjem pripadajuće jednadžbe izračunata je IC_{50} vrijednost, koja definira onu koncentraciju ispitivane tvari koja inhibira rast 50% stanica u kulturi.

3.2.4. Protočna citometrija

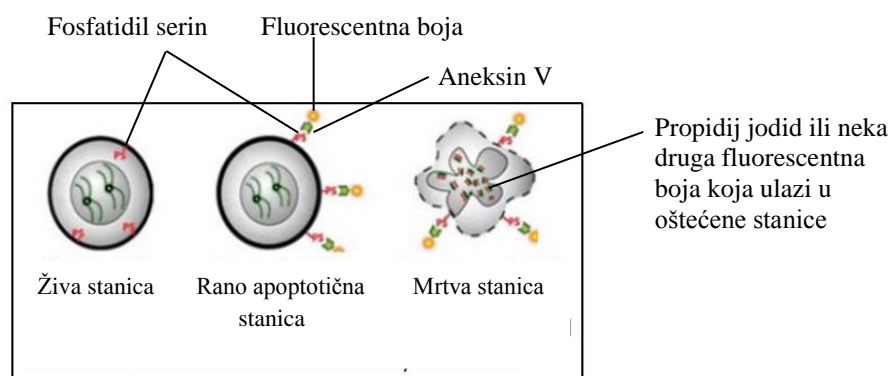
Protočna citometrija je metoda koja se koristi za sortiranje stanica na temelju njihovih svojstava (izgled i volumen stanica) te omogućuje istovremenu analizu fizičkih i kemijskih značajki na temelju različitih parametara pri čemu je moguće analizirati i do tisuću stanica u sekundi. Primjena protočne citometrije omogućava analizu velikog broja stanica u vrlo kratkom vremenu stoga je to vrlo dobra i relativno brza kvantitativna analiza. Koristi se u različitim istraživanjima, kliničkim ispitivanjima te u dijagnostičke svrhe s ciljem otkrivanja mehanizma djelovanja tvari na različite stanične procese, kao što su utjecaj na stanični ciklus, aktivacija određenog oblika smrti stanice (apoptoza, starenje, mitotska smrt) te aktivacija odnosno inhibicija gena i proteina.

Protočna citometrija primijenjena je u ovom radu kako bi se ispitalo uzrokuje li djelovanje NSAID-ova na stanične linije zastoj staničnog ciklusa (primjena Muse™ Cell Cycle Kita) ili potiče staničnu smrt (primjena Muse™ Annexin V & Dead Cell Kita). Postupak je proveden prema uputama proizvođača.

3.2.4.1. Određivanje tipa stanične smrti primjenom Muse™ Annexin V & Dead Cell Kita

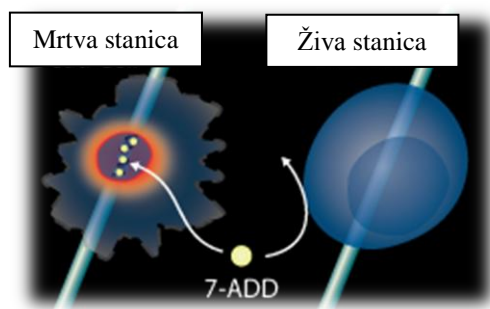
Apoptoza, ili programirana smrt stanica, važan je stanični proces koji je u ravnoteži sa staničnom diobom, a s ciljem održavanja homeostaze organizma. Stanice reagiraju na različite izvanstanične ili unutarstanične signale pokretanjem specifičnih signalnih puteva koji rezultiraju karakterističnim biokemijskim i morfološkim promjenama.

U početnoj fazi apoptoze dolazi do translokacije fosfolipida fosfatidil serina (PS) s unutrašnje na vanjsku stranu stanične membrane. Protein aneksin V, koji je označen s fluorescentnim bojama, specifično se veže na PS na vanjskoj membrani apoptotičnih stanica te se kao takav koristi za detektiranje apoptoze pomoću protočne citometrije (slika 4), najčešće uz primjenu još jedne boje kao što je npr. propidij jodid koji ulazi u oštećene stanice, veže za DNA i fluorescira u kasno apoptotičnim, odnosno mrtvim, nekrotičnim stanicama.



Slika 4. Razlikovanje tri populacije stanica unutar uzorka na temelju obilježavanja s fluorescentno obilježenim proteinom aneksin V (prema Millipore, 2013)

Muse™ Annexin V & Dead Cell reagens osim fluorescentno obilježenog aneksina V sadrži i 7-aminoaktinomycin D (7-AAD) koji služi kao marker za mrtve stanice i pokazatelj je integriteta stanične membrane. Njime neće biti obilježene žive i zdrave stanice te one rano apoptotičke. 7-AAD je fluorescentni interkalator koji ima spektralni pomak prilikom stvaranja kompleksa 7-AAD/DNK te se primjenjuje pri analizi uzoraka fluorescentnom mikroskopijom i protočnom citometrijom. 7-AAD se uglavnom izlučuje iz živih stanica te se koristi za obilježavanje stanica koje imaju oštećenu staničnu membranu ili su prethodno fiksirane i permeabilizirane (slika 5).



Slika 5. Obilježavanje stanica primjenom fluorescentne boje 7-aminoaktinomycin D (7-AAD) (prema Millipore, 2013)

Na temelju dvostrukog obilježavanja stanica primjenom Muse™ Annexin V & Dead Cell Kit-a moguće je razlikovati četiri populacije stanica unutar analiziranog uzorka:

- žive i zdrave stanice: aneksin V (-) i 7-AAD (-)
- rano apoptotične stanice: aneksin V (+) i 7-AAD (-)
- kasno apoptotične stanice i mrtve stanice: aneksin V (+) i 7-AAD (+)
- mrtve stanice i stanični ostaci: aneksin V (-) i 7-AAD (+)

Budući da je jedna od prvih promjena u ranoj apoptozi premještanje PS s unutrašnje na vanjsku stranu membrane, ova metoda omogućuje raniju detekciju apoptoze nego metode kojima se određuje DNA fragmentacija ili aktivacija kaspaza. No pri korištenju aneksina V i interpretaciji rezultata treba imati na umu i činjenicu da eksternalizacija fosfatidil serina nije prisutna u svim stanicama tijekom apoptoze (svega oko 30%) te da se javlja relativno rano nakon segmentiranja stanične jezgre.

Protokol za određivanje tipa stanične smrti proveden je prema uputama proizvođača. Nakon uzgoja stanica, naciepljivanja i tretmana NSAID-ima tijekom 72 sata, kako je opisano u poglavlju 3.2.2., slijedi tripsinizacija svakog uzorka, pri čemu se medij u kojem su uzgajane stanice ne baca već se spoji s tripsiniziranim stanicama. Od tuda se uzima alikvot (20 μ L) za određivanje broja stanica u uzorku, a nakon toga, stanice se centrifugiraju, baca se supernatant te se stanice resuspendiraju u odgovarajućem volumenu DMEM-a s minimalno 1% FBS-a kako bi konačna koncentracija stanica u uzorku bila $1-5 \times 10^5$ stanica mL^{-1} . U 100 μ L suspenzije stanica doda se 100 μ L Muse™ Annexin V & Dead Cell reagensa te se inkubira 20

minuta na sobnoj temperaturi, zaštićeno od svjetla. Prije mjerenja na Muse uređaju svaki uzorak potrebno je lagano resuspendirati kako agregirane stanice ne bi začepile cjevčice. Zatim se postavljaju parametri analize s negativnom i pozitivnom kontrolom te se analiziraju pojedinačni uzorci. Za svaki uzorak postavljene su po dvije paralele, a određivanje tipa stanične smrti ponovljeno je dva puta.

3.2.4.2. *Određivanje zastoja u staničnoj diobi primjenom Muse™ Cell Cycle Kita*

Stanični ciklus jedan je od najznačajnijih procesa u eukariotskim stanicama, koji rezultira rastom stanice i podjelom na dvije stanice kćeri, stoga je regulacija staničnog ciklusa ključna za preživljavanje stanica. Regulacija staničnog ciklusa usko je vezana za popravak genetičkog materijala i sprječavanje nekontrolirane stanične diobe. Poremećaji u regulaciji staničnog ciklusa su karakteristična osobina tumorskih stanica, a mutacije u genima koji su uključeni u kontrolu staničnog ciklusa vrlo su česte kod oboljelih od raka. S obzirom na to, analiza staničnog ciklusa važna je za razumijevanje djelovanja antitumorskih spojeva.

Muse™ Cell Cycle Kit omogućuje kvantitativno mjerenje postotka stanica u G_0/G_1 , S i G_2/M fazama staničnog ciklusa primjenom Muse™ analizatora staničnog zdravlja. Kit sadrži reagens koji uključuje boju propidij jodid (PI) koja interkalira u nuklearnu DNK što omogućuje razlikovanje populacija stanica u različitim fazama staničnog ciklusa na temelju različitog sadržaja DNK. Stanice u G_0/G_1 fazi sadrže dvije kopije svakog kromosoma. Kako se stanice počinju dijeliti, sintetiziraju kromosomsku DNK (S faza). Intenzitet fluorescencije PI povećava se sve dok se sva kromosomska DNK ne udvostruči (G_2/M faza). U ovoj fazi, G_2/M stanice fluoresciraju s dvostrukim intenzitetom od G_0/G_1 populacije. G_2/M stanice na kraju se podijele u dvije stanice.

Protokol za određivanje postotka stanica u svakoj fazi staničnog ciklusa proveden je prema uputama proizvođača. Metoda započinje uzgojem, naciepljivanjem i tretmanom stanica te fiksiranjem stanica, za što je potrebno oko 1×10^6 stanica mL^{-1} . Suspenzija stanica se zatim centrifugira (300xg, 5 min), supernatant odbaci te se staničnom peletu doda PBS (1×10^6 stanica mL^{-1}) i resuspendira. Ponovno slijedi centrifugiranje te odbacivanje supernatanta tako da na dnu ostane otprilike 50 μL PBS za 1×10^6 stanica u čemu se one resuspendiraju. U 1 mL svježeg pripravljenog ledeno hladnog 70% etanola dodaje se kap po kap suspenzije stanica uz vorteksiranje na srednjoj brzini te se tako pripravljene stanice ostave u zamrzivaču na -20°C najmanje 3 sata, a može i preko noći, da se fiksiraju. Nakon fiksiranja slijedi obilježavanje,

odnosno bojanje stanica PI tako da se izuzme alikvot od 200 μL fiksiranih stanica, centrifugira (300xg, 5 min), odbaci supernatant, a talog stanica se resuspendira u PBS puferu (0,25 mL PBS za 5×10^5 stanica). Nakon još jednog centrifugiranja, supernatant se baca te se talog stanica resuspendira u 200 μL Muse™ Cell Cycle reagensa i inkubira 30 minuta na sobnoj temperaturi, zaštićeno od svijetla. Zatim slijedi analiza na Muse™ uređaju koja započinje postavljanjem parametara analize nakon čega se analiziraju pojedinačni uzorci. Za svaki uzorak postavljene su po dvije paralele, a određivanje tipa stanične smrti ponovljeno je dva puta.

3.3. OBRADA REZULTATA

Rezultati su prikazani kao srednje vrijednosti (\bar{x}) uzoraka u skupini:

$$\bar{x} = \frac{1}{n} \sum_{i=1}^n x_i \quad [3]$$

s pripadajućim standardnim devijacijama S.D.:

$$\text{S.D.} = \sqrt{\frac{\sum (x_i - \bar{x})^2}{n}} \quad [4]$$

gdje je n ukupan broj uzoraka u skupini, a x_i pojedinačna vrijednost uzoraka.

4. REZULTATI I RASPRAVA

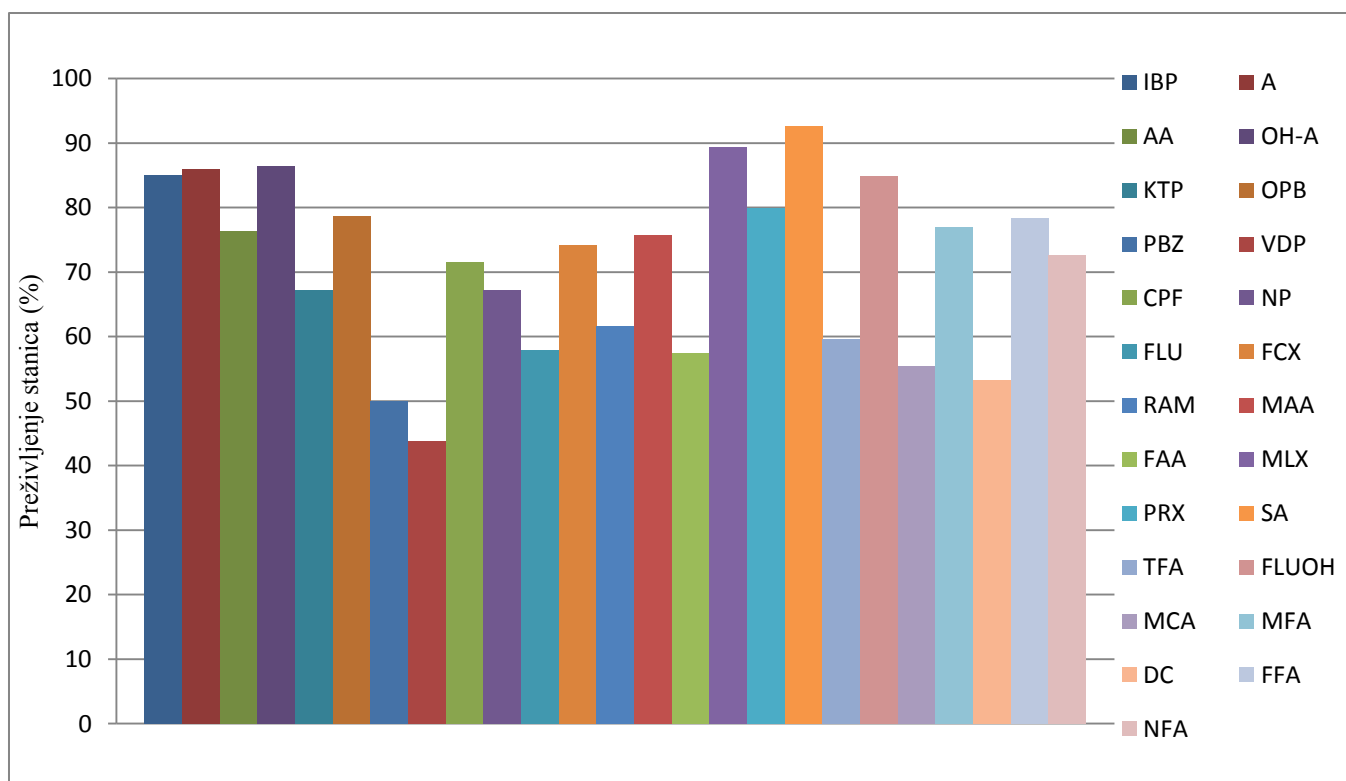
Nesteroidni protuupalni lijekovi su najčešće korišteni analgetici u svijetu, čija se kronična uporaba povećava sa starosnom dobi, unatoč nizu dokazanih neželjenih nuspojava. Analgetske dobrobiti NSAID-ova poznate su od davnina, kada su ljudi koristili koru vrbe za mišićno-koštanu bol, a tek kasnije je učinak tog narodnog „lijeka“ pripisan NSAID-ovima kao djelatnim tvarima. Mehanizam djelovanja NSAID-ova otkriven je 1971. godine kada Sir John Vane i Piper dokazuju da NSAID-ovi blokiraju enzimsku aktivnost ciklooksigenaze te posljedično biosintezu prostaglandina. U stanicama sisavaca identificirane su dvije različite izoforme ciklooksigenaza, COX-1 i COX-2. Tradicionalni, neselektivni NSAID-ovi inhibiraju obje izoforme te su povezani s različitim stupnjem gastrointestinalnog rizika, jer konstitutivno prisutna aktivnost COX-1 katalizira nastajanje prostaglandina koji štite sluznicu gastrointestinalnog trakta. S druge strane, selektivni COX-2 inhibitori inhibiraju samo inducibilnu COX-2 izoformu čija je ekspresija inducirana u mnogim tkivima tijekom upale, zacjeljivanja rana i nastanka novotvorevina te imaju sličnu učinkovitost kao tradicionalni NSAID-ovi, ali s manjim nepoželjnim učincima na gastrointestinalni sustav.

Unatrag nekoliko desetljeća, NSAID-i se intenzivno istražuju obzirom na njihov antitumorski potencijal za koji se pretpostavlja da je posljedica inhibicije aktivnosti enzima COX-2 koji je prekomjerno eksprimiran u mnogim ljudskim tumorima. Stoga su baš visokoselektivni inhibitori COX-2 zanimljivi i intenzivno se istražuju kao obećavajuća antikancerogena sredstva. Također, novije studije ukazuju na to da određeni NSAID-ovi preko COX-2 nezavisnih mehanizama iskazuju svoje antitumorsko djelovanje što upućuje na postojanje do sada nepoznatih mehanizama djelovanja tih lijekova. Navedena zapažanja potaknula su brojna istraživanja koja dokazuju da mnogi NSAID-ovi štite organizam od nastanka i razvoja različitih tipova karcinoma kao što su karcinom želuca, jednjaka, jezika, mozga, pluća, gušterače, dojke, prostate i jajnika. Najviše je istraženo djelovanje NSAID-ova na obiteljsku adenomatoznu polipozu i za nju vezanu sklonost obolijevanju od karcinoma debelog crijeva za čiju terapiju je FDA odobrila celekoksib, čija upotreba rezultira znatnim smanjenjem broja polipa i adenoma.

4.1. *In vitro* ispitivanje citotoksičnosti NSAID-ova

Alternativni *in vitro* testovi na kontinuiranim staničnim linijama koriste se za ispitivanje potencijala koju određene tvari imaju kao antitumorski agensi na temelju određivanja relativnog stupnja inhibicije rasta ili citotoksičnosti za svaku korištenu staničnu liniju. Prema tako dobivenim rezultatima vrši se odabir spojeva za daljnja *in vitro* i *in vivo* istraživanja onih spojeva koji imaju antitumorsko djelovanje odnosno iskazuju potencijal za razvoj lijekova.

U ovom radu je korištena MCF-7 stanična linija, koja se nalazi na listi za *in vitro* primarni probir Nacionalnog instituta za rak (eng. *National Cancer Institute*, NCI) (NCI, 2015) te se često koristi u istraživanjima antitumorskog djelovanja raznih spojeva. Stoga je primarni probir odabranih 25 NSAID-ova, navedenih u tablici 2, napravljen upravo na MCF-7 staničnoj liniji. Ukratko, stanice su naciepljene te su nakon 24 sata tretirane sa 100 μ M lijeka. 72 sata nakon tretmana, kolorimetrijskom MTS metodom određeno je preživljenje MCF-7 stanica i prikazano kao postotak preživljenja tretiranih stanica u odnosu na netretirane, kontrolne stanice, što je prikazano na slici 6.



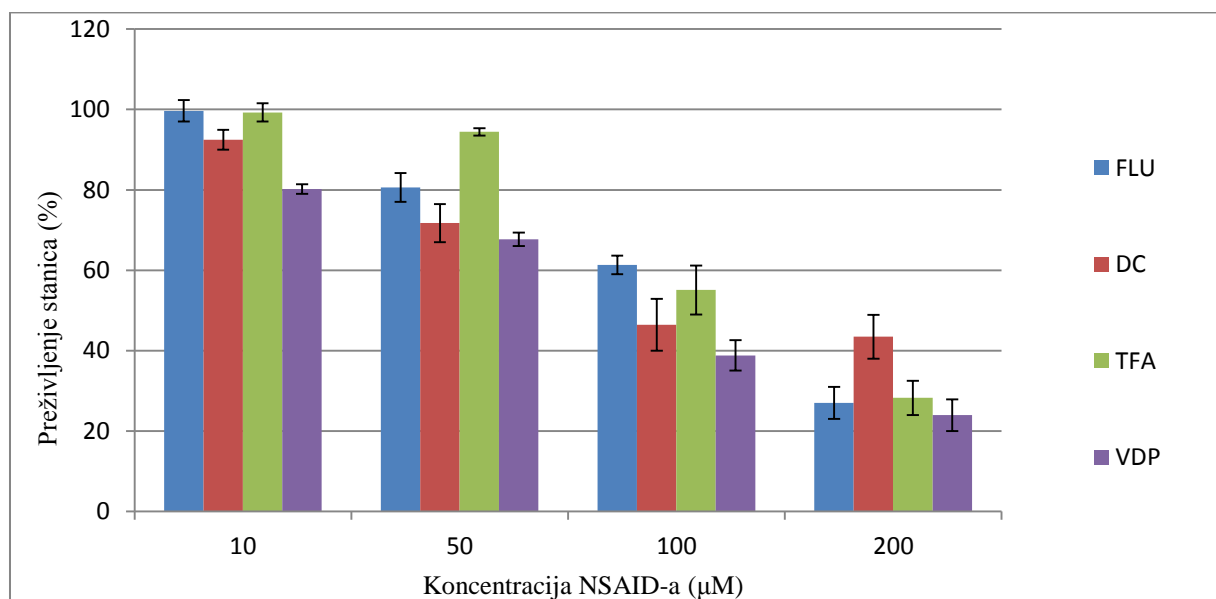
Slika 6. Preživljenje MCF-7 stanica nakon 72-satnog tretmana s 25 različitih NSAID-a u koncentraciji 100 µM

IBP, ibuprofen; A, antipirin; AA, 4-aminoantipirin; OH-A, 4-hidroksiantipirin; KTP, ketoprofen; OPB, oksifenburazon; PBZ, fenilbutazon; VDP, vedaprofen; CPF, karprofen; NP, naproksen; FLU, fluniksin; FCX, firokoksib; RAM, ramifenazon; MAA, 4-metilaminoantipirin; FAA, 4-formilaminoantipirin; MLX, meloksikam; PRX, piroksikam; SA, salicilatna kiselina; TFA, tolfenamatna kiselina; FLUOH, 5-hidroksifluniksin; MCA, meklofenamatna kiselina; MFA, mefenamatna kiselina; DC, diklofenak; FFA, flufenamatna kiselina; NFA, niflumanatna kiselina.

Iz rezultata prikazanih na slici 6, vidljivo je da većina ispitanih NSAID-ova u 100 µM koncentraciji iskazuje određeni postotak citotoksičnosti, odnosno inhibicije rasta MCF-7 stanica i to u rasponu od oko 7% (SA) do 66% (VDP). Obzirom da je korištena humana tumorska stanična linija, koja je na NCI listi za probir spojeva s antitumorskim potencijalom, ovim početnim probirom potvrđena je pretpostavka da NSAID-i imaju antitumorsko djelovanje.

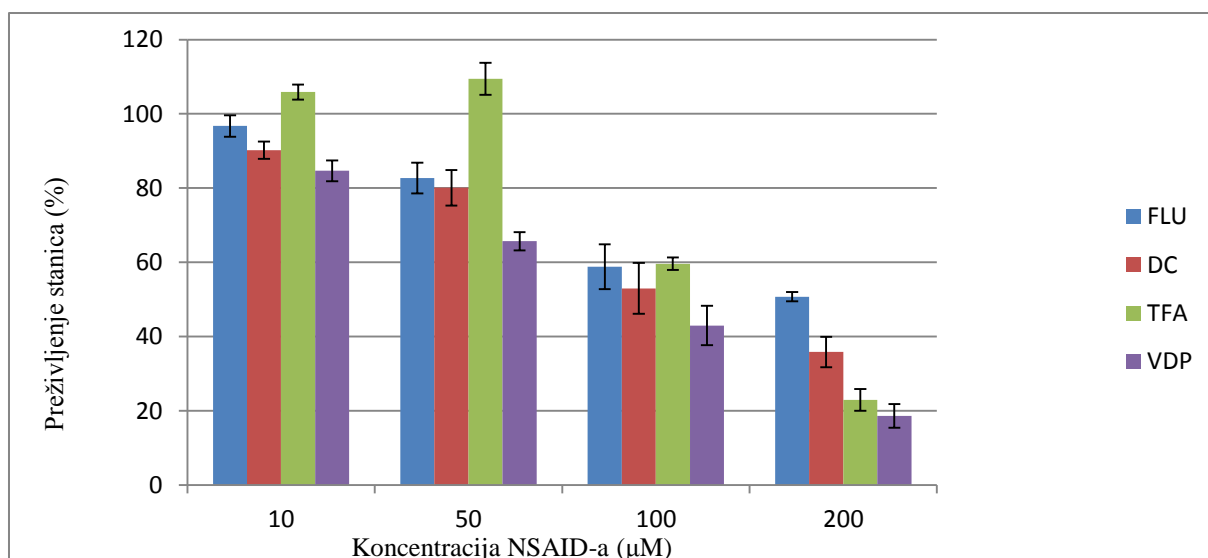
Na temelju prikazanih rezultata početnog probira (slika 6) vidljivo je da najmanje izražen citotoksični učinak na MCF-7 stanice imaju salicilatna kiselina (SA), meloksikam (MLX) i 4-hidroksiantipirin (OH-A), dok su najizraženiji citotoksični učinak na MCF-7 stanice imali vedaprofen (VDP), fluniksin (FLU), tolfenamatna kiselina (TFA) i diklofenak (DC) stoga su

upravo ti NSAID-ovi odabrani za daljnje ispitivanje i na drugim humanim staničnim linijama: HEK293T, HepG2 i HeLa. Kao što je prethodno opisano u poglavlju 3.2.2., MCF-7, HepG2, HeLa i HEK293T stanice tretirane su različitim koncentracijama (10 μ M, 50 μ M, 100 μ M i 200 μ M) odabrana četiri NSAID-a te je nakon 72 sata određen njihov učinak na preživljenje tih stanica što je prikazano na slikama 7, 8, 9 i 10.



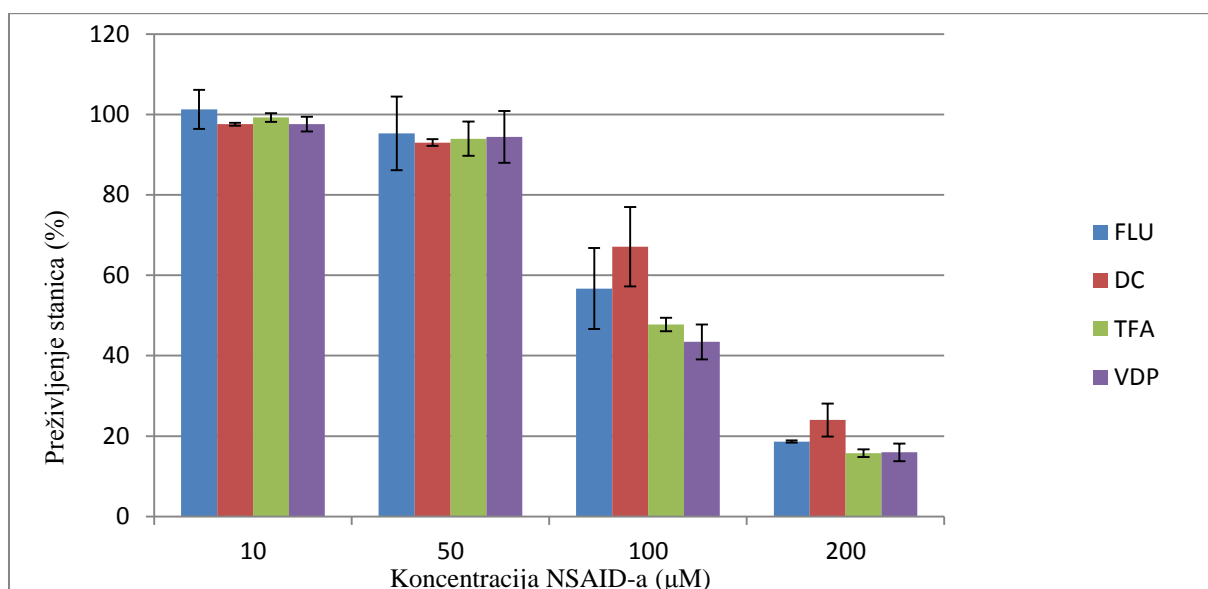
Slika 7. Preživljenje MCF-7 stanica nakon 72-satnog tretmana različitim koncentracijama vedaprofena (VDP), fluniksina (FLU), tolfenamatne kiseline (TFA) i diklofenaka (DC)

U skladu s rezultatima početnog probira, najizraženije citotoksično djelovanje na MCF-7 stanice ima VDP i to pri sve četiri ispitane koncentracije s najmanjim postotkom preživljenja stanica pri najvećoj ispitanoj koncentraciji od 200 μ M (23,93%). Linearno povećanje citotoksičnosti odnosno smanjenje preživljenja stanica ovisno o primjenjenoj koncentraciji slijede i FLU (27%), TFA (28,25%) te DC koji pokazuje najmanji citotoksični učinak na tretiranim stanicama kod najveće koncentracije ispitnog lijeka (43,46%) (slika 7).



Slika 8. Preživljenje HepG2 stanica nakon 72-satnog tretmana različitim koncentracijama vedaprofena (VDP), fluniksina (FLU), tolfenamatne kiseline (TFA) i diklofenaka (DC)

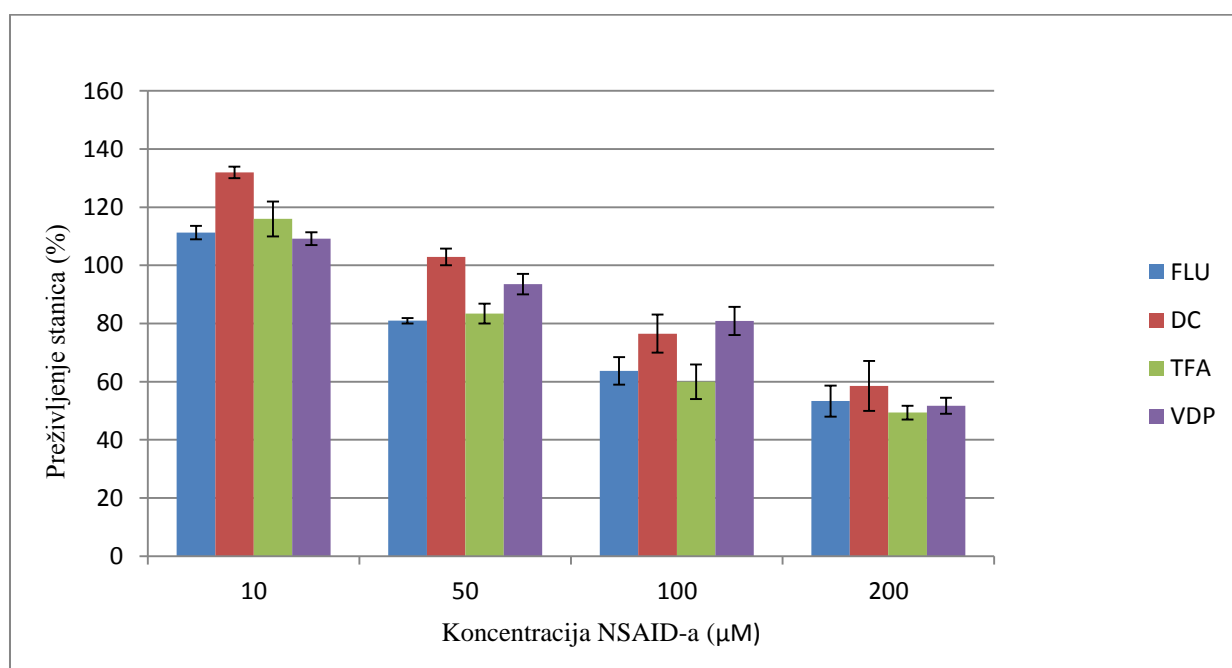
Slično rezultatima na MCF-7 stanicama, VDP ima najjači citotoksični učinak na HepG2 staničnoj liniji, koji raste s upotrijebljenom dozom i najveći postotak inhibicije je malo veći u odnosu na MCF-7 (76,07%) te iznosi 81,4% kod 200 µM koncentracije VDP-a. Prema zapaženom inhibitornom učinku zatim slijede TFA (77,07%), DC (64,18%), te FLU (49,29%) s najslabijim citotoksičnim učinkom na HepG2 stanice kod 200 µM koncentracije lijeka (slika 8).



Slika 9. Preživljenje HeLa stanica nakon 72-satnog tretmana različitim koncentracijama vedaprofena (VDP), fluniksina (FLU), tolfenamatne kiseline (TFA) i diklofenaka (DC)

Svi ispitani lijekovi pokazuju najjači citotoksični učinak na HeLa staničnoj liniji pri najvećoj koncentraciji NSAID-ova, odnosno preživljenje stanica se proporcionalno smanjuje s porastom koncentracije NSAID-a. Najmanji postotak preživljenja HeLa stanica zapažen je kod TFA (15,76%) i VDP (15,95%) u 200 μ M koncentraciji NSAID-a. Malo manje citotoksično djelovanje pokazuje FLU (18,65%), dok je DC (23,99%) pokazao najslabiji citotoksični učinak na HeLa staničnoj liniji (slika 9). Dakle, zapaženi citotoksični učinak na sve tri tumorske stanične linije ovisan je o koncentraciji ispitivane tvari za četiri NSAID-a te se može pretpostaviti da ispitani spojevi imaju antitumorski potencijal, koji nadalje treba istražiti.

Kod *in vitro* ispitivanja antitumorskog djelovanja neke tvari na humanim staničnim linijama pretpostavlja se razlika u djelovanju na tumorske stanice i one porijeklom iz zdravog, normalnog tkiva, pri čemu je očekivani rezultat jači inhibitorni učinak na rast tumorskih nego normalnih stanica. Stoga je u ovom radu učinak odabrana četiri NSAID-a ispitan i na HEK293T staničnoj liniji porijeklom iz zdravog tkiva što je prikazano na slici 10.



Slika 10. Preživljenje HEK293T stanica nakon 72-satnog tretmana različitim koncentracijama vedaprofena (VDP), fluniksina (FLU), tolfenamatne kiseline (TFA) i diklofenaka (DC)

Rezultati prikazani na slici 10 u skladu su s očekivanjima, odnosno najslabiji citotoksični učinak NSAID-ova zapažen je na normalnim HEK293T stanicama pri čemu je i ovdje učinak ovisan o koncentraciji ispitivanog lijeka. Najjači citotoksični učinak pokazuje TFA s najvećim postotkom inhibicije pri 200 μM koncentraciji lijeka (50,62%), a zatim slijede VDP (48,24%), FLU (46,68%) te DC (41,43%).

Eksperimentalni podatci o preživljenju tretiranih MCF-7, HepG2, HeLa i HEK293T stanica aproksimirani su odgovarajućim krivuljama koje najbolje opisuju dobivene rezultate ($R^2 \sim 1$) te su iz jednadžbi pripadajućih krivulja izračunate IC_{50} vrijednosti za sva četiri NSAID-a za pojedinu staničnu liniju i prikazane u tablici 3.

Tablica 3. IC_{50} vrijednosti za odabrane NSAID-ove ispitane na četiri stanične linije

NSAID	Stanična linija			
	MCF-7	HEK293T	HepG2	HeLa
FLUNIKSIN	130,47	n.i.*	n.i.*	127,5
DIKLOFENAK	95,41	n.i.*	123,86	145,21
TOLFENAMATNA KISELINA	130,32	200,95	141,28	113,51
VEDAPROFEN	78,19	205,09	83,57	106,28

*n.i. = nije izračunato iz eksperimentalnih podataka

Manja IC_{50} vrijednost odgovara jačem citotoksičnom učinku ispitivane tvari te prema izračunatim IC_{50} vrijednostima (tablica 3) možemo zaključiti da najjači citotoksični učinak ima vedaprofen na MCF-7 stanice ($\text{IC}_{50}=78,19 \mu\text{M}$), a zatim slijede diklofenak ($\text{IC}_{50}=95,41 \mu\text{M}$), tolfenamatna kiselina ($\text{IC}_{50}=130,32 \mu\text{M}$) te fluniksini ($\text{IC}_{50}=130,47 \mu\text{M}$) na istoj staničnoj liniji, za koju stoga možemo reći da je najosjetljivija na djelovanje ispitivanih NSAID-ova. Vedaprofen također ima najjači učinak i na preostale dvije tumorske stanične linije, HepG2 i HeLa, $83,57 \mu\text{M}$ odnosno $106,28 \mu\text{M}$, što je u skladu s primarnim probirom na MCF-7 stanicama gdje se VDP pokazao najcitotoksičnijim među 25 testiranih NSAID-a. Najveće IC_{50} vrijednosti izračunate su za HEK293T staničnu liniju, porijeklom iz zdravog tkiva, a u odnosu na preostale tri humane tumorske stanične linije korištene u ovom radu. Kao što je već spomenuto, takav rezultat je pozitivan pri istraživanju antitumorskog djelovanja ispitivanih lijekova, jer ukazuje na to da ispitani NSAID-i imaju potencijal kao antitumorski lijekovi za

daljnja *in vivo* ispitivanja te da se pri tome može očekivati jači antiproliferativni ili inhibitorni učinak na tumorske nego na zdrave stanice.

Prema Sankpal i suradnicima (2013), tolfenamatna kiselina selektivno inhibira rast Panc1, L3.6pl i MiaPaCa-2 tumorskih stanica, dok je u normalnim i diferenciranim stanicama, hTERT-HPNE i SH-SY5Y, zabilježen blagi citotoksični učinak, što je u skladu s rezultatima prikazanim u ovom radu. Slično su pokazali Kim i suradnici (2013), u čijem radu je dokazano da TFA inhibira proliferaciju i potiče apoptozu u MDA-MB-231 stanicama raka dojke, što je u skladu s ovdje prikazanim rezultatima na MCF-7 staničnoj liniji raka dojke. Obzirom na navedene literaturne podatke i naše rezultate, može se pretpostaviti da TFA ima potencijal kao lijek za terapiju raka dojke.

Eksperimentalne studije dokazuju da diklofenak inhibira proliferaciju stanica raka ovisno o koncentraciji (Smirnova i sur., 2012), a u istraživanju koje su proveli Yagi i suradnici (2014), 50 $\mu\text{g mL}^{-1}$ DC-a inhibira proliferaciju HepG2 stanične linije pri čemu je zabilježeno preživljenje oko 75% stanica, što je slično rezultatima dobivenim u ovom ispitivanju. Slične rezultate, na istoj staničnoj liniji objavili su Chen i Wu (2006) koji su ispitivali djelovanje DC-a na HepG2 stanice te ustvrdili da on nakon 24, 48 i 72 sata značajno inhibira proliferaciju tih tumorskih stanica ovisno o koncentraciji, s postotkom inhibicije od 40,47% nakon 48 sati izloženosti 50 μM diklofenaku i IC_{50} vrijednošću od 70,54 μM . U ovom radu najjači antiproliferativni učinak na rast tumorskih stanica ima vedaprofen, za koji u dostupnoj znanstvenoj literaturi nismo našli podatke o *in vitro* ispitivanjima, no obzirom da su rezultati za TFA i DC u skladu s objavljenim rezultatima drugih znanstvenika, možemo zaključiti da VDP-a ima obećavajući antitumorski potencijal. No, svakako su nužna daljnja ispitivanja njegovog djelovanja i mogućnosti primjene kao antitumorskog lijeka za razne tipove karcinoma, budući da je pokazao citotoksični učinak na tri različite tumorske stanične linije.

Pri ispitivanju učinka NSAID-ova na rast MCF-7, HepG2, HeLa i HEK293T stanica zapažena je slabija ili jača inhibicija rasta stanica, ovisna o koncentraciji i vrsti lijeka, te su uočene određene promjene u izgledu tretiranih u odnosu na kontrolne stanice. Stoga su s ciljem utvrđivanja morfoloških promjena izazvanih djelovanjem ispitivanih lijekova, HEK293T i HepG2 stanice 72 sata nakon tretmana slikane pod svjetlosnim mikroskopom (slika 11).



Slika 11. Svjetlosna mikroskopija HEK293T i HepG2 stanica nakon 72 sata tretmana s 100 μ M NSAID-a (povećanje 400 x). HEK293T stanice: a) kontrolne, b) tretirane s FLU, c) tretirane s DC, d) tretirane s TFA, e) tretirane s VDP. HepG2 stanice: f) kontrolne, g) tretirane s FLU, h) tretirane s DC, i) tretirane s TFA, j) tretirane s VDP

Pri svjetlosnoj mikroskopiji HEK293T i HepG2 stanica uočene su morfološke promjene tretiranih stanica u odnosu na kontrolne stanice. Kod kontrolnih stanica vidljive su dobro

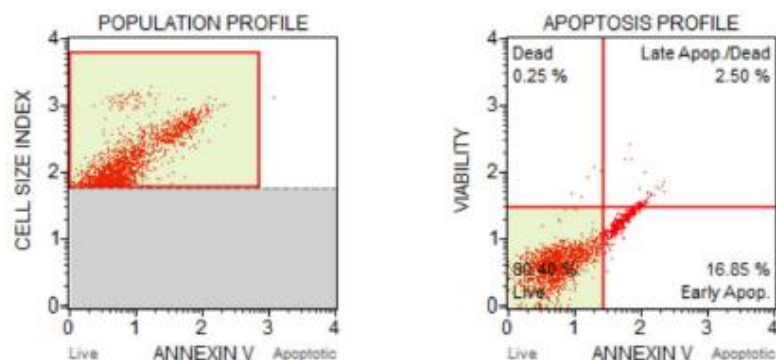
prihvaćene stanice tipičnog fibroblastnog, odnosno epitelnog izgleda. U obje kulture nakon tretmana ispitanim NSAID-ovima (100 μ M) smanjen je broj stanica, narušen je izgled staničnog monosloja i vidljiv je gubitak kontakta između stanica zbog čega se stanice zaokružuju i odvajaju od podloge za rast što u konačnici rezultira njihovom manjom brojnošću. Za okrugle stanice, kod kojih je vidljiva kondenzacija kromatina i jezgre, možemo pretpostaviti da su apoptotične stanice, jer su to početna biokemijska obilježja stanične smrti procesom apoptoze, što je svakako potrebno još dokazati nekom drugom metodom.

4.2. Određivanje mehanizma citotoksičnog djelovanja NSAID-ova protočnom citometrijom

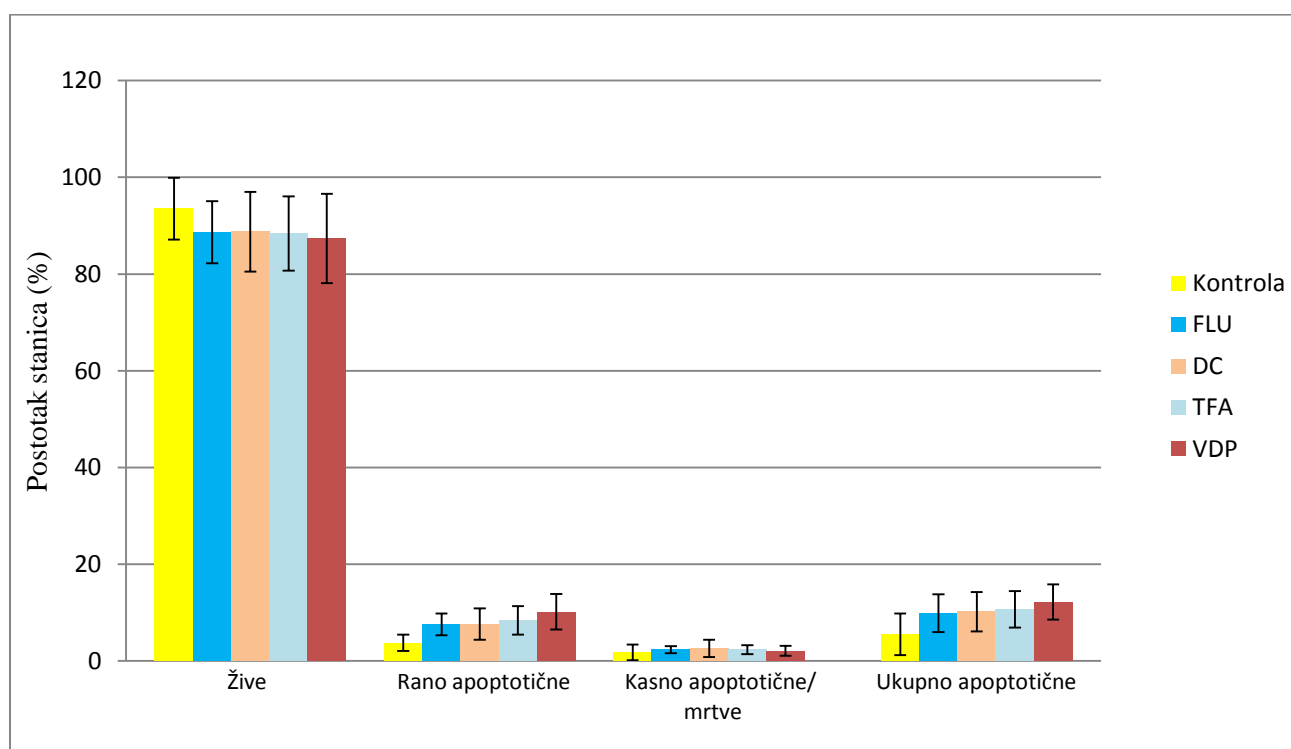
Zapaženi citotoksični učinak NSAID-ova na korištene stanične linije može biti posljedica utjecaja na različite stanične procese. Najčešće je smanjenje preživljenja tretiranih stanica posljedica indukcije stanične smrti ili inhibicije stanične diobe zbog djelovanja ispitivane tvari. Stoga je u ovom radu primjenom protočne citometrije ispitan mehanizam citotoksičnog djelovanja NSAID-ova. Korišten je *Muse™ Cell Analyzer* te je primjenom *Muse™ Cell Cycle Kit*-a ispitan utjecaj NSAID-a na stanični ciklus, dok je *Muse™ Annexin V & Dead Cell Kit* korišten za određivanje tipa stanične smrti u stanicama tretiranim NSAID-ovima.

4.2.1. Učinak NSAID-a i stanična smrt

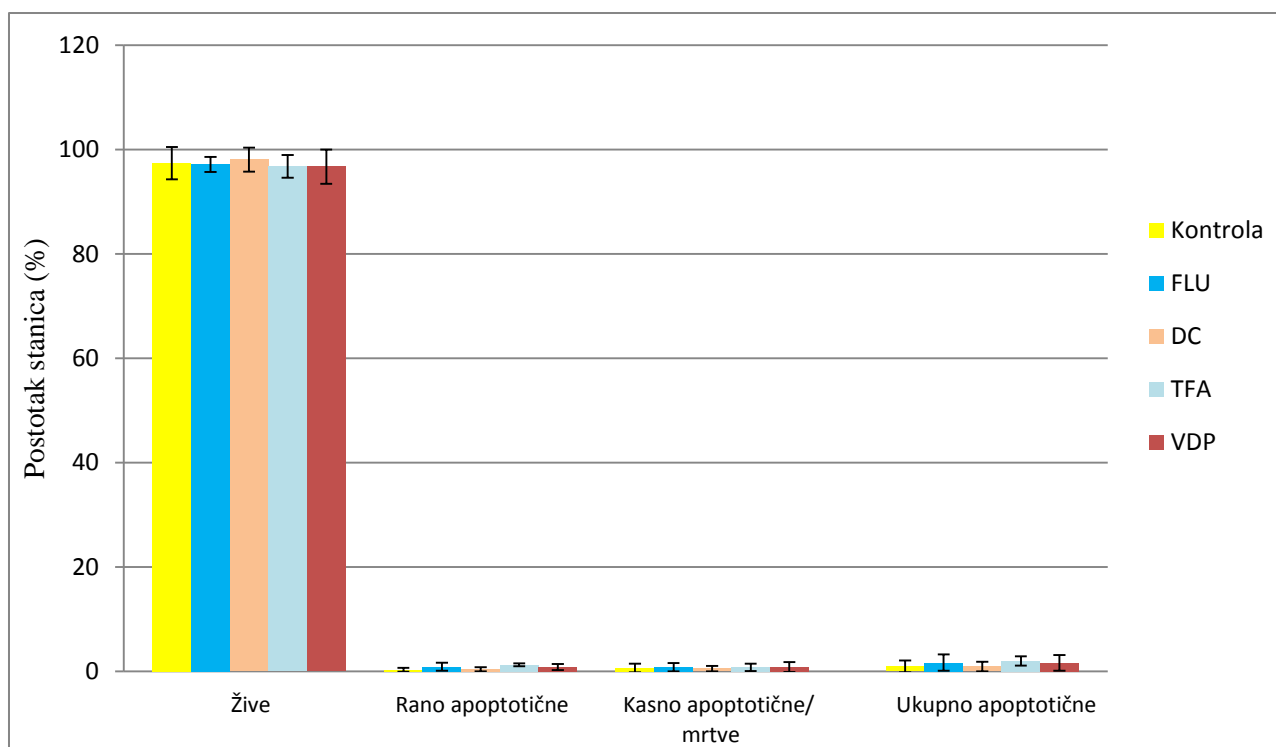
Stanice su uzgojene te tretirane nakon 24 sata sa 100 μ M NSAID-a. Iz suspenzije stanica pripremljene prema protokolu proizvođača, odnosno kako je opisano u poglavlju 3.2.4.1., uzme se alikvot od 100 μ L te se zatim doda isti volumen *Muse™ Annexin V & Dead Cell Kit* reagensa i inkubira 20 minuta zaštićeno od svjetla. Nakon postavljanja parametara analize s negativnom i pozitivnom kontrolom na *Muse* uređaju kreće se s analizom pojedinačnih uzoraka pri čemu su rezultati vidljivi kao „dot-plot“ dijagrami (slika 12), a parametri mjerenja su postavljeni tako da je moguće razlikovati četiri populacije stanica unutar uzorka: žive, rane apoptotične, kasno apoptotične/mrtve te mrtve stanice. Analizirane su MCF-7 stanice (slika 13) kao humana tumorska stanična linija koja se u ispitivanju citotoksičnosti pokazala najosjetljivijom te HEK293T stanice (slika 14), kao normalna stanična linija porijeklom iz zdravog tkiva.



Slika 12. Prikaz jednog reprezentativnog „dot-plot“ dijagrama dobivenog prilikom određivanja tipa stanične smrti primjenom Muse™ Annexin V & Dead Cell Kit-a nakon 72-satnog djelovanja vedaprofena (VDP) na MCF-7 staničnu liniju



Slika 13. Postotak živih, stanica u ranoj apoptozi, kasno apoptotičnih/mrtvih stanica te ukupno apoptotičnih MCF-7 stanica nakon tretmana vedaprofenom (VDF), fluniksonom (FLU), tolfenamatnom kiselinom (TFA) i diklofenakom (DC) u koncentraciji od 100 μ M



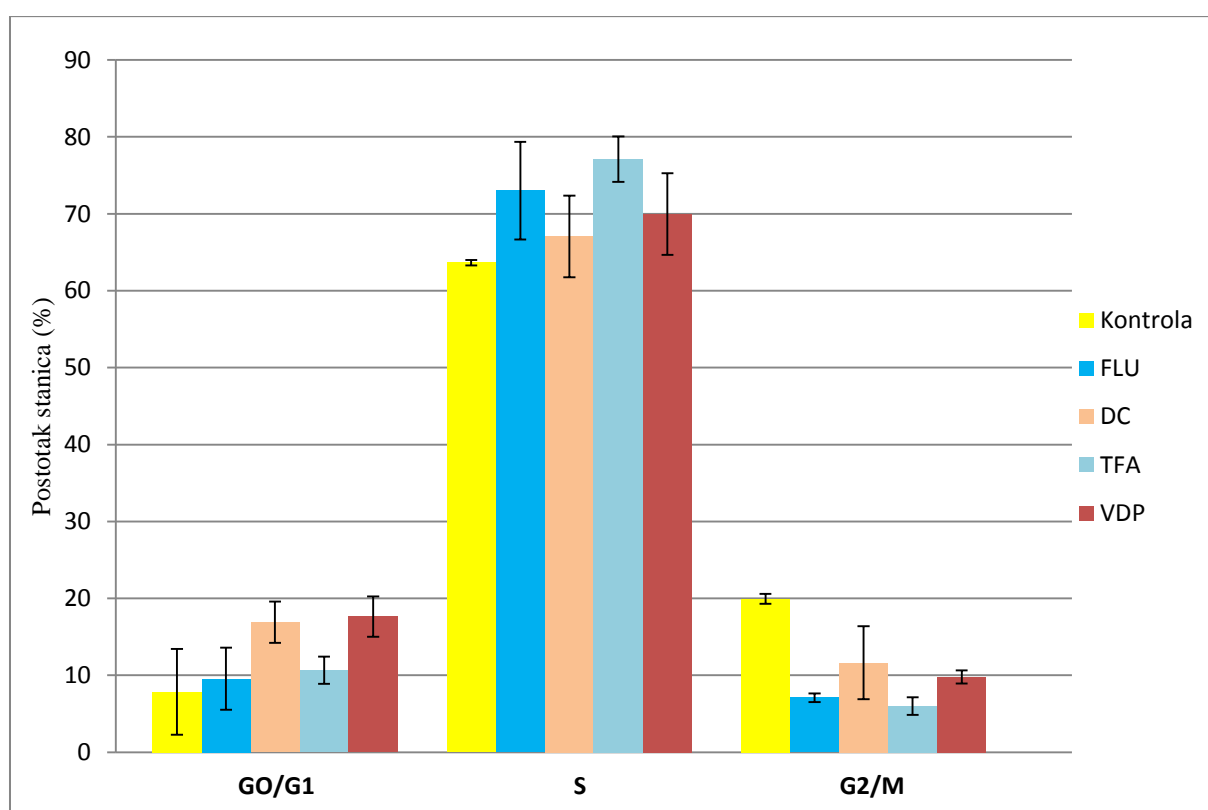
Slika 14. Postotak živih, stanica u ranoj apoptozi, kasno apoptotičnih/mrtvih stanica te ukupno apoptotičnih HEK293T stanica nakon tretmana vedaprofenom (VDF), fluniksonom (FLU), tolfenamatnom kiselinom (TFA) i diklofenakom (DC) u koncentraciji od 100 μ M

Jedan od prethodno opisanih mehanizama kojim NSAID-ovi mogu inhibitorno djelovati na nastanak i rast tumora je poticanje, odnosno indukcija apoptoze u stanicama raka. Prema rezultatima mjerenja postotka živih stanica, stanica u ranoj apoptozi, kasno apoptotičnih/mrtvih stanica te ukupno apoptotičnih MCF-7 stanica nakon tretmana sa 100 μ M vedaprofena, fluniksina, tolfenamatne kiseline i diklofenaka prikazanih na slici 13, uočena je mala razlika u postotku živih te ukupnih apoptotičnih stanica kod tretiranih u odnosu na kontrolne MCF-7 stanice (5,48%), pri čemu je porast postotka ukupnih apoptotičnih stanica (12,21%) najizraženiji kod vedaprofena (slika 13) koji je pokazao i najjači citotoksični učinak. S druge strane, kod normalne HEK293T stanične linije (slika 14) ne postoji značajna razlika u postotcima unutar populacija stanica, pri čemu je postotak populacije živih stanica vrlo visok i sličan između kontrolnih (97,40%) i stanica tretiranih VDF-om (96,73%). Stoga se može zaključiti da je indukcija apoptoze nakon tretmana ispitivanim NSAID-ovima značajnija kod tumorskih MCF-7 stanica nego kod normalnih HEK293T stanica, pri čemu vedaprofen osim što ima najizraženije citotoksično djelovanje ima i najjači proapoptotični učinak. Nakon VDF-a, najjači učinak na apoptozu MCF-7 stanica ima tolfenamatna kiselina,

tretman koji je rezultirao s 10,67% ukupno apoptotičnih stanica (slika 13). U dostupnoj literaturi nema podataka obzirom na sposobnost vedaprofena da potakne apoptozu u tumorskim stanicama, ali poznato je da TFA selektivno utječe na rast tumorskih stanica, tako da potiče transkripciju tumor supresora, što rezultira apoptozom stanica kolorektalnog karcinoma, te inhibira ekspresiju transkripcijskih faktora koji pridonose proliferaciji metastazirajućih tumora, čija je prekomjerna ekspresija negativni čimbenik preživljavanja kod mnogih ljudskih karcinoma. Osim navedenog mehanizma antitumorskog djelovanja TFA putem indukcije apoptoze, TFA također utječe na ekspresiju receptora vaskularnog endotelijskog faktora rasta (eng. *vascular endothelial growth factor receptor-1*, VEGFR-1) te na taj način smanjuje angiogenezu i rast tumora *in vivo*. Također, poznato je da TFA iskazuje značajan citotoksični učinak u *in vitro* uvjetima na stanice karcinoma pluća, ali i u *in vivo* uvjetima, na miševima (Ligget i sur., 2014).

4.2.2. Učinak NSAID-a i stanična dioba

Nakon 72 sata tretmana stanica ispitivanim NSAID-ima (100 μ M) MCF-7 stanice su prema uputama proizvođača i kako je opisano u poglavlju 3.2.4.2. prvo fiksirane te obojane na način da je izuzet alikvot od 200 μ L fiksiranih stanica te nakon dva centrifugiranja talog stanica resuspendiran u 200 μ L reagensa iz Muse™ Cell Cycle Kit-a i inkubiran 30 minuta na sobnoj temperaturi, zaštićeno od svjetla. Zatim slijedi analiza na Muse™ uređaju, koja započinje postavljanjem parametara analize nakon čega se analiziraju pojedinačni uzorci, a rezultati dva ponovljena mjerenja prikazani su na slici 15.



Slika 15. Postotak MCF-7 stanica u pojedinim fazama staničnog ciklusa nakon tretmana vedaprofenom (VDP), fluniksinom (FLU), tolfenamatnom kiselinom (TFA) i diklofenakom (DC) u koncentraciji od 100 μ M

Nakon 72-satnog tretmana MCF-7 stanica 100 μ M koncentracijama NSAID-ova izmjeren je veći postotak stanica u G₀/G₁ fazi staničnog ciklusa nego u kontrolnoj grupi, s prisutnim pripadajućim smanjenjem postotka stanica u G₂/M fazi. Najveća razlika u odnosu na kontrolu

($G_0/G_1=7,85\%$, $G_2/M=19,95\%$), uočena je nakon tretmana VDP-om ($G_0/G_1=17,65\%$, $G_2/M=9,8\%$). Zatim slijede DC ($G_0/G_1=16,9\%$, $G_2/M=11,65\%$), TFA ($G_0/G_1=10,65\%$, $G_2/M=6\%$) te FLU s najmanjom razlikom u raspodjeli stanica u G_0/G_1 u odnosu na kontrolu ($G_0/G_1=9,55\%$, $G_2/M=7,1\%$). Navedeni rezultati sugeriraju da je inhibicija stanične proliferacije povezana s indukcijom zastoja staničnog ciklusa u G_0/G_1 fazi te da su razlike u proliferaciji stanica koje su tretirane u odnosu na netretirane kontrolne stanice zbog razlike u regulaciji staničnog ciklusa, odnosno zbog utjecaja NSAID-a na stanični ciklus.

Prema Basha i suradnicima (2011), koji su ispitivali mehanizam antitumorskog djelovanja TFA na stanice karcinoma jajnika, SKOV3-AF2 i ES-2, 50 μ M koncentracija TFA nakon 48-satnog tretmana rezultirala je također zaustavljanjem staničnog ciklusa u G_0/G_1 fazi. Do sličnih rezultata su došli i Eslin i suradnici (2013) na LA1-55n i SH-SY5Y staničnim linijama neuroblastoma kod kojih je TFA značajno inhibirala stanični ciklus uzrokujući 71%-tni (LA1 55n) i 59%-tni (SH-SY5Y) zastoj stanica u G_0/G_1 u fazi u usporedbi s 30% -tnim (LA1 55n) i 31%-tnim (SH-SY5Y) u kontrolnim stanicama nakon 24-satnog tretmana. Zaustavljanje u G_0/G_1 pratilo je odgovarajuće smanjenje postotka stanica u S i G_2/M fazama, što je slično rezultatima dobivenim u ovom radu gdje je također zapažen porast udjela stanica u G_0/G_1 uz smanjenje postotka stanica u G_2/M fazi.

U eukariotskim stanicama, aktivnost različitih proteina regulira rast i potiče stanični ciklus u različitim fazama, što dovodi do podjele stanica. Dobiveni rezultati upućuju na to da ispitani NSAID-ovi djeluju na događaje u ranijim fazama staničnog ciklusa te na zaključak da je zastoj staničnog ciklusa u G_0/G_1 fazi djelomično odgovoran za zapaženi inhibični učinak na rast tumorskih stanica. No obzirom, da na temelju prikazanih rezultata ne možemo jasno razlučiti koji je mehanizam, indukcija stanične smrti ili inhibicija staničnog ciklusa, ključan za zapaženi antitumorski učinak vedaprofena, fluniksina, tolfenamatne kiseline i diklofenaka nužna su daljnja ispitivanja navedenih NSAID-ova.

Također, unatoč sve većem broju *in vitro* i *in vivo* eksperimentalnih dokaza da NSAID-ovi posjeduju antitumorsku aktivnost, za razvijanje terapijske strategije za njihovu primjenu u liječenju raka, potrebna su daljnja istraživanja staničnih i molekularnih mehanizama djelovanja NSAID-a te farmako-kinetičke studije kako bi primjena navedenih lijekova u borbi protiv karcinoma bila učinkovita i sigurna.

5. ZAKLJUČCI

Na temelju provedenih istraživanja i dobivenih rezultata može se zaključiti:

1. Prema rezultatima početnog probira, svih 25 ispitanih nesteroidnih protuupalnih lijekova u 100 μ M koncentraciji izazivaju citotoksični učinak, odnosno inhibiraju u određenom postotku rast MCF-7 stanica.
2. Najizraženiji citotoksični učinak na MCF-7 stanice imaju vedaprofen, fluniksin, tolfenamatna kiselina i diklofenak, koji su ispitani na još dvije tumorske (HepG2 i HeLa) i jednoj normalnoj (HEK293T) staničnoj liniji.
3. Učinak ispitanih NSAID-ova nakon 72 sata tretmana (u rasponu koncentracija 10 μ M do 200 μ M) ovisan je o koncentraciji te je najjači inhibitorni učinak sva četiri spoja na sve četiri stanične linije zabilježen pri najvećoj ispitanoj koncentraciji (200 μ M). Najjači citotoksični učinak na MCF-7 i HepG2 stanice je izazvao vedaprofen, dok je na HeLa i HEK293T stanice najjače djelovala tolfenamatna kiselina.
4. Prema izračunatim IC_{50} vrijednostima najjači citotoksični učinak na sve tri tumorske stanične linije ima vedaprofen, pa zatim slijede tolfenamatna kiselina, fluniksin te diklofenak. Najveće IC_{50} vrijednosti izračunate su za HEK293T staničnu liniju, porijeklom iz zdravog tkiva, što ukazuje na to da ispitani NSAID-i imaju jači antiproliferativni ili inhibitorni učinak na tumorske nego na zdrave stanice stoga imaju potencijal kao antitumorski lijekovi.
5. Indukcija apoptoze nakon tretmana NSAID-ovima izraženija je kod tumorskih MCF-7 stanica nego kod normalnih HEK293T stanica, pri čemu vedaprofen ima najjači proapoptotični učinak.
6. Tretman NSAID-ovima rezultira zastojem staničnog ciklusa u G_0/G_1 fazi te se može pretpostaviti da ispitani spojevi djeluju na događaje u ranijim fazama staničnog ciklusa čime se djelomično može objasniti zapaženi antiproliferacijski učinak u tumorskim staničnim linijama.
7. Potrebna su daljnja istraživanja mehanizama djelovanja ispitanih NSAID-ova budući da dobiveni rezultati nisu dovoljni da bi se jednoznačno povezao mehanizam djelovanja i zapažena antitumorska aktivnost NSAID-ova.

6. LITERATURA

Arber, N., Eagle, C. J., Spicak, J., Rácz, I., Dite, P., Hajer, J., Zavoral, M., Lechuga, M. J., Gerletti, P., Tang, J., Rosenstein, R. B., Macdonald, K., Bhadra, P., Fowler, R., Wittes, J., Zauber, A. G., Solomon, S. D., Levin, B. (2006) Celecoxib for the prevention of colorectal adenomatous polyps. *N. Engl. J. Med.* **355**, 885-895.

Baron, J. A., Sandler, R. S., Bresalier, R. S., Quan, H., Riddell, R., Lanas, A., Bolognese, J. A., Oxenius, B., Horgan, K., Loftus, S., Morton, D. G. (2006) A randomized trial of rofecoxib for the chemoprevention of colorectal adenomas. *Gastroenterology* **131**, 1674-1682.

Basha, R., Ingersoll, S. B., Sankpal, U. T., Ahmad, S., Baker, C. H., Edwards, J. R., Holloway, R. W., Kaja, S., Abdelrahim, M. (2011) Tolfenamic acid inhibits ovarian cancer cell growth and decreases the expression of c-Met and survivin through suppressing specificity protein transcription factors. *Gynecol. Oncol.* **122**, 163–70.

Bennett, A., Del Tacca, M. (1975) Proceedings: Prostaglandins in human colonic carcinoma. *Gut* **16**, 409-409.

Bertagnolli, M. M., Eagle, C. J., Zauber, A. G., Redston, M., Solomon, S. D., Kim, K., Tang, J., Rosenstein, R. B., Wittes, J., Corle, D., Hess, T. M., Woloj, G. M., Boissarie, F., Anderson, W. F., Viner, J. L., Bagheri, D., Burn, J., Chung, D. C., Dewar, T., Foley, T. R., Hoffman, N., Macrae, F., Pruitt, R. E., Saltzman, J. R., Salzberg, B., Sylwestrowicz, T., Gordon, G. B., Hawk, E. T. (2006) Celecoxib for the prevention of sporadic colorectal adenomas. *N. Engl. J. Med.* **355**, 873-884.

Boyd, M. R., Paull, K. D. (1995) Some Practical Considerations and Applications of the National Cancer Institute in Vitro Anticancer Drug Discovery Screen. *Drug Develop. Res.* **34**, 91–109.

Breyer, R. M., Bagdassarian, C. K., Myers, S. A., Breyer, M. D. (2001) Prostanoid receptors: subtypes and signaling. *Annu. Rev. Pharmacol. Toxicol.* **41**, 661-690.

Brune, K., Hinz, B. (2004) The discovery and development of antiinflammatory drugs. *Arthritis Rheum.* **50**, 2391–2399.

Catela Ivkovic, T. (2010) Cyclooxygenase isoforms in tumorigenesis. *Period. Biol.* **112**, 441-449.

Catela Ivković, T (2014) Uloga izoformi ciklooksigenaza u tumorigenezi sporadičnoga karcinoma debeloga crijeva. Doktorska disertacija, Prirodoslovno-matematički fakultet, Zagreb.

Cathcart, M. C., Lysaght, J., Pidgeon, G. P. (2011) Eicosanoid signalling pathways in the development and progression of colorectal cancer: novel approaches for prevention/intervention. *Cancer Metastasis Rev.* **30**, 363-385.

Chang, H. C., Weng, C. F. (2001) Cyclooxygenase-2 level and culture conditions influence NS398-induced apoptosis and caspase activation in lung cancer cells. *Oncol. Rep.* **8**, 1321–1325.

Chen, N. N., Wu, S. G. (2006) [Diclofenac suppresses hepatoma cell proliferation and promotes cyclooxygenase-2 mRNA expression]. *Nan Fang Yi Ke Da Xue Xue Bao.* **26**, 814-817.

Chi, X., Morgan Freeman, B., Tong, M., Zhao, Y., Tai, H. H. (2009) 15-Hydroxyprostaglandin dehydrogenase (15-PGDH) is up-regulated by flurbiprofen and other non-steroidal anti-inflammatory drugs in human colon cancer HT29 cells. *Arch. Biochem. Biophys.* **487**, 139-145.

Cohen, E. G., Almahmeed, T., Du, B., Golijanin, D., Boyle, J. O., Soslow, R. A., Subbaramaiah, K., Dannenberg, A. J. (2003) Microsomal prostaglandin E synthase-1 is overexpressed in head and neck squamous cell carcinoma. *Clin. Cancer Res.* **9**, 3425–3430.

Conaghan, P.G. (2012) A turbulent decade for NSAIDs: update on current concepts of classification, epidemiology, comparative efficacy, and toxicity. *Rheumat. Int.* **32**, 1491-1502.

Cook, J. A. (2005) Eicosanoids. *Crit. Care Med.* **33**, 488-491.

Costa, C., Soares, R., Reis-Filho, J. S., Leitão, D., Amendoeira, I., Schmitt, F. C. (2002) Cyclooxygenase 2 expression is associated with angiogenesis and lymph node metastasis in human breast cancer. *J. Clin. Pathol.* **55**, 429–434.

Covell, D. G., Huang, R., Wallqvist, A. (2007) Anticancer medicines in development: assessment of bioactivity profiles within the National Cancer Institute anticancer screening data. *Mol. Cancer Ther.* **6**, 2261-2270.

Dai, Z.-J., Ma, X.-B., Kang, H.-F., Gao, J., Min, W.-L., Guan, H.-T., Diao, Y., Lu, W.-F., Wang, X.-J. (2012) Antitumor activity of the selective cyclooxygenase-2 inhibitor, celecoxib, on breast cancer in *Vitro* and in *Vivo*. *Cancer Cell Int.* **12**, 53-61.

Dandekar, D. S., Lopez, M., Carey, R. I., Lokeshwar, B. L. (2005) Cyclooxygenase-2 inhibitor celecoxib augments chemotherapeutic drug induced apoptosis by enhancing activation of caspase-3 and -9 in prostate cancer cells. *Int. J. Cancer* **115**, 484–492.

Day, R. O., Graham, G. G., Williams, K. M. (1988) Pharmacokinetics of non-steroidal anti-inflammatory drugs. *Clin. Rheumatol.* **2**, 363–393.

Dermond, O., Ruegg, C. (2001) Inhibition of tumor angiogenesis by non-steroidal anti-inflammatory drugs: emerging mechanisms and therapeutic perspectives. *Drug Resist. Updat.* **4**, 314–321.

Dubois, R. N., Abramson, S. B., Crofford, L., Gupta, R. A., Simon, L. S., Van De Putte, L. B., Lipsky, P. E. (1998) Cyclooxygenase in biology and disease. *FASEB J.* **12**, 1063–1073.

Ekwall, B. (1995) The basal cytotoxicity concept. U: Alternative Methods in Toxicology and the Life Sciences, (Goldberg, A., van Zutphen, L., ured.), The World Congress on 54 Alternatives and Animal Use in the Life Sciences: Education, Researches, Testing, 11. Mary Ann Libert, New York, str. 721- 725.

Eslin, D., Sankpal, U. T., Lee, C., Sutphin, R. M., Maliakal, P., Currier, E., Sholler, G., Khan, M., Basha, R. (2013) Tolfenamic acid inhibits neuroblastoma cell proliferation and induces apoptosis: a novel therapeutic agent for neuroblastoma. *Mol. carcinog.* **52**, 377-386.

Fent, K. (2001) Fish cell lines as versatile tools in ecotoxicology: assesment of cytotoxicity, cytochrome P4501A induction potential and estrogenic activity of chemicals and enviromental samples. *Toxicol. In Vitro.* **15**, 477-488.

Funk, C. D., Funk, L. B., Kennedy, M. E., Pong, A. S., Fitzgerald, G. A. (1991) Human platelet/erythroleukemia cell prostaglandin G/H synthase: cDNA cloning, expression, and gene chromosomal assignment. *FASEB J.* **5**, 2304-2312.

Gately, S. (2000) The contributions of cyclooxygenase-2 to tumor angiogenesis. *Cancer Metastasis Rev.***19**, 19–27.

Gately, S., Li, W. W. (2004) Multiple roles of COX-2 in tumor angiogenesis: a target for antiangiogenic therapy. *Semin. Oncol.* **31**, 2–11.

Grosch, S., Tegeder, I., Niederberger, E., Bräutigam, L., Geisslinger, G. (2001) COX-2 independent induction of cell cycle arrest and apoptosis in colon cancer cells by the selective COX-2 inhibitor celecoxib. *FASEB J.* **15**, 2742–2744.

Hawkey, C. J., Cullen, D. J. E., Pearson, G., Holmes, S., Doherty, S., Wilson, J. V., Garrud, P., Garner, P., Maynard, A., Logan, R. F. A. (2000) Pharmacoepidemiology of non-steroidal anti-inflammatory drug use in Nottingham general practices. *Aliment. Pharmacol. Ther.* **14**, 177–185.

He, T. C., Chan, T. A., Vogelstein, B., Kinzler, K. W. (1999) PPARdelta is an APCregulated target of nonsteroidal anti-inflammatory drugs. *Cell* **99**, 335–345.

Hida, T., Yatabe, Y., Achiwa, H., Muramatsu, H., Kozaki, K., Nakamura, S., Ogawa, M., Mitsudomi, T., Sugiura, T., Takahashi, T. (1998) Increased expression of cyclooxygenase 2 occurs frequently in human lung cancers, specifically in adenocarcinomas. *Cancer Res.* **58**, 3761–3764.

Huang, M., Sharma, S., Mao, J. T., Zhu, L., Miller, P. W., Wollman, J., Herschman, H., Dubinett, S. M. (1996) Non-small cell lung cancer-derived soluble mediators and

prostaglandin E2 enhance peripheral blood lymphocyte IL-10 transcription and protein production. *J. Immunol.* **157**, 5512–5520.

Huang, Y. C., Chuang, L. Y., Hung, W. C. (2002) Mechanisms underlying nonsteroidal anti-inflammatory drug-induced p27(Kip1) expression. *Mol. Pharmacol.* **62**, 1515–1521.

Hung, W. C., Chang, H. C., Pan, M. R., Lee, T.-H., Chuang, L.-Y. (2000) Induction of p27(KIP1) as a mechanism underlying NS398-induced growth inhibition in human lung cancer cells. *Mol. Pharmacol.* **58**, 1398–1403.

Hwang, D., Scollard, D., Byrne, J., Levine, E. (1998) Expression of cyclooxygenase-1 and cyclooxygenase-2 in human breast cancer. *J. Natl. Cancer Inst.* **90**, 455–460.

Jaffe, B. M. (1974) Prostaglandins and cancer: an update. *Prostaglandins* **6**, 453–461.

Jazirehi, A. R., Bonavida, B. (2004) Resveratrol modifies the expression of apoptotic regulatory proteins and sensitizes non-Hodgkin's lymphoma and multiple myeloma cell lines to paclitaxel-induced apoptosis. *Mol. Cancer Ther.* **3**, 71–84.

Jones, R. (2001) Nonsteroidal anti-inflammatory drug prescribing: past, present, and future. *Am. J. Med.* **110**, 4S–7S.

Kardosh, A., Blumenthal, M., Wang, W. J., Chen, T. C., Schonthal, A. H. (2004) Differential effects of selective COX-2 inhibitors on cell cycle regulation and proliferation of glioblastoma cell lines. *Cancer Biol. Ther.* **3**, 55–62.

Kern, M. A., Schubert, D., Sahi, D., Schöneweiß, M. M., Moll, I., Haugg, A. M., Dienes, H. P., Breuhahn, K., Schirmacher, P. (2002) Proapoptotic and antiproliferative potential of selective cyclooxygenase-2 inhibitors in human liver tumor cells. *Hepatology* **36**, 885–894.

Kim, H. J., Cho, S. D., Kim, J., Kim, S. J., Choi, C., Kim, J. S., Nam, J. S., Han Kwon, K., Kang, K. S., Jung, J. Y. (2013) Apoptotic effect of tolafenamic acid on MDA-MB-231 breast cancer cells and xenograft tumors. *J. Clin. Biochem. Nutr.* **53**, 21-26.

Kinzler, K. W., Vogelstein, B. (1998) Colorectal tumors. U: The Genetic Basis of Human Cancer (Vogelstein, B., Kinzler, K. W., ured), McGraw-Hill, New York, str. 565–587.

Kniewald, J., Kmetič, I., Gaurina Srček, V., Kniewald, Z. (2005) Alternative models for toxicity testing of xenobiotics. *Arh. Hig. Rada Toksiko.* **56**, 195-204.

Kovala-Demertzi, D., Hadjipavlou-Litina, D., Staninska, M., Primikiri, A., Kotoglou, C., Demertzis, M. A. (2009) Anti-oxidant, in vitro, in vivo anti-inflammatory activity and antiproliferative activity of mefenamic acid and its metal complexes with manganese(II), cobalt(II), nickel(II), copper(II) and zinc(II). *J. Enzyme Inhib. Med. Chem.* **24**, 742-752.

Kundu, N., Smyth, M. J., Samsel, L., Fulton, A. M. (2002) Cyclooxygenase inhibitors block cell growth, increase ceramide and inhibit cell cycle. *Breast Cancer Res. Treat.* **76**, 57–64.

Kutchera, W., Jones, D. A., Matsunami, N., Groden, J., McIntyre, T. M., Zimmerman, White, R. L., Prescott, S. M. (1996) Prostaglandin H synthase 2 is expressed abnormally in human colon cancer: evidence for a transcriptional effect. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* **93**, 4816–4820.

Laine, L. (1996) Nonsteroidal anti-inflammatory drug gastropathy. *Gastrointest. Endosc. Clin. N. Am.* **6**, 489–504.

Li, G., Yang, T., Yan, J. (2002) Cyclooxygenase-2 increased the angiogenic and metastatic potential of tumor cells. *Biochem. Biophys. Res. Commun.* **299**, 886–890.

Liggett, J. L., Zhang, X., Eling, T. E., Seung Joon Baek, S. J. (2014) Anti-tumor activity of non-steroidal anti-inflammatory drugs: Cyclooxygenase-independent targets. *Cancer Lett.* **346**, 217–224.

Lin, M. T., Lee, R. C., Yang, P. C., Ho, F. M., Kuo, M. L. (2001) Cyclooxygenase-2 inducing Mcl-1-dependent survival mechanism in human lung adenocarcinoma CL1.0 cells. Involvement of phosphatidylinositol 3-kinase/Akt pathway. *J. Biol. Chem.* **276**, 48997–49002.

Maier, T. J., Schilling, K., Schmidt, R., Geisslinger, G., Grösch, S. (2004) Cyclooxygenase- 2 (COX-2)-dependent and -independent anticarcinogenic effects of celecoxib in human colon carcinoma cells. *Biochem. Pharmacol.* **67**, 1469–1478.

Marnett, L. J. (1992) Aspirin and the Potential Role of Prostaglandins in Colon Cancer. *Cancer Res.* **52**, 5575-5589.

Millipore (2013) Muse™ Annexin V & Dead Cell Kit User's Guide: *Catalog No. MCH100105 (100 Tests)*. Merck KGaA, Darmstadt Germany.

Morin, P. J., Vogelstein, B., Kinzler, K. W. (1996) Apoptosis and Apc in Colorectal Tumorigenesis. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* **93**, 7950–7954.

Mutoh, M., Watanabe, K., Kitamura, T., Shoji, Y., Takahashi, M., Kawamori, T., Tani, K., Kobayashi, M., Maruyama, T., Kobayashi, K., Ohuchida, S., Sugimoto, Y., Narumiya, S., Sugimura, T., Wakabayashi, K. (2002) Involvement of prostaglandin E receptor subtype EP(4) in colon carcinogenesis. *Cancer Res.* **62**, 28–32.

Nam, D. H., Park, K., Park, C., Im, Y. H., Kim, M. H., Lee, S., Hong, S. C., Shin, H. J., Kim, J. H., Eoh, W., McDonnell, T. J. (2004) Intracranial inhibition of glioma cell growth by cyclooxygenase-2 inhibitor celecoxib. *Oncol. Rep.* **11**, 263–268.

Narayanan, B. A., Condon, M. S., Bosland, M. C., Narayanan, N. K., Reddy, B. S. (2003) Suppression of N-methyl-N-nitrosourea/testosteroneinduced rat prostate cancer growth by celecoxib: effects on cyclooxygenase-2, cell cycle regulation, and apoptosis mechanism(s). *Clin. Cancer Res.* **9**, 3503–3513.

NCI-National Cancer Institute (2015) <https://dtp.cancer.gov/discovery_development/nci-60/cell_list.html> . Pristupljeno 06. lipnja 2017.

Okami, J., Yamamoto, H., Fujiwara, Y., Tsujie, M., Kondo, M., Noura, S., Oshima, S., Nagano, H., Dono, K., Umeshita, K., Ishikawa, O., Sakon, M., Matsuura, N., Nakamori, S., Monden, M. (1999) Overexpression of cyclooxygenase-2 in carcinoma of the pancreas. *Clin. Cancer Res.* **5**, 2018–2024.

Paganini-Hill, A., Chao, A., Ross, R., Henderson, B. (1989) Aspirin use and chronic diseases: a cohort study of the elderly. *Br. Med. J.* **299**, 1247–1250.

Pai, R., Soreghan, B., Szabo, I. L., Pavelka, M., Baatar, D., Tarnawski, A. S. (2002) Prostaglandin E2 transactivates EGF receptor: a novel mechanism for promoting colon cancer growth and gastrointestinal hypertrophy. *Nat. Med.* **8**, 289–293.

Rao, P. N. P., Knaus, E. E. (2008) Evolution of nonsteroidal antiinflammatory drugs (NSAIDs): cyclooxygenase (COX) inhibition and beyond. *J. Pharm. Pharmaceut. Sci.* **11**, 81–110.

Sankpal, U. T., Lee, C.M., Connelly, S. F., Kayaleh, O., Eslin, D., Sutphin, R., Goodison, S., Adwan, L., Zawia, N. H., Lichtenberger, L. M., Basha, R. (2013) Cellular and organismal toxicity of the anti-cancer small molecule, tolfenamic acid: a pre-clinical evaluation. *Cell Physiol. Biochem.* **32**, 675–686.

Sheng, H., Shao, J., Kirkland, S. C., Isakson, P., Coffey, R. J., Morrow, J., Beauchamp, R. D., DuBois, R. N. (1997) Inhibition of human colon cancer cell growth by selective inhibition of cyclooxygenase-2. *J. Clin. Invest.* **99**, 2254–2259.

Sigal, E. (1991) The molecular biology of mammalian arachidonic acid metabolism. *Am. J. Physiol.* **260**, 13–28.

Silverstein, F. E., Faich, G., Goldstein, J. L., Simon, L. S., Pincus, T., Whelton, A., Makuch, R., Eisen, G., Agrawal, N. M., Stenson, W. F., Burr, A. M., Zhao, W. W., Kent, J. D., Lefkowitz, J. B., Verburg, K.M., Geis, G. S. (2000) Gastrointestinal toxicity with celecoxib vs nonsteroidal anti-inflammatory drugs for osteoarthritis and rheumatoid arthritis: the CLASS study: a randomized controlled trial. Celecoxib Long-term Arthritis Safety Study. *JAMA.* **284**, 1247–1255.

Silverstein, F. E., Graham, D.Y., Senior, J. R., Davies, H. W., Struthers, B. J., Bittman, R. M., Geis, G. S. (1995) Misoprostol reduces serious gastrointestinal complications in patients with rheumatoid arthritis receiving nonsteroidal anti-inflammatory drugs. A randomized, double-blind, placebo-controlled trial. *Ann. Intern. Med.* **123**, 241–249.

Simmons, D. L., Botting, R. M., Hla, T. (2004) Cyclooxygenase isozymes: the biology of prostaglandin synthesis and inhibition. *Pharmacol. Rev.* **56**, 387–437.

Singh, G., Fort, J. G., Goldstein, J. L., Levy, R. A., Hanrahan, P. S., Bello, A. E., Andrade-Ortega, L., Wallemark, C., Agrawal, N. M., Eisen, G. M., Stenson, W. F., Triadafilopoulos, G. (2006) Celecoxib versus naproxen and diclofenac in osteoarthritis patients: SUCCESS-I Study. *Am. J. Med.* **119**, 255–266.

Smirnova, A.V., Lazebnik, L.B., Trubitsina, I.E. (2012) Antiproliferative activity of diclofenac at tumor cell cultures. *Eksp. Klin. Gastroenterol.* **5**, 66–69.

Smith, W. L. (1989) The eicosanoids and their biochemical mechanisms of action. *Biochem. J.* **259**, 315-324.

Smith, W. L., DeWitt, D. L., Garavito, R. M. (2000) Cyclooxygenases: structural, cellular, and molecular biology. *Annu. Rev. Biochem.* **69**, 145-182.

Smyth, E. M., Grosser, T., Wang, M., Yu, Y., FitzGerald, G. A. (2009) Prostanoids in health and disease. *J. Lipid Res.* **50**, 423-428.

Soriano-Hernandez, A. D., Madrigal-Pérez, D., Galvan-Salazar, H. R., Martinez-Fierro, M. L., Valdez-Velazquez, L. L., Espinoza-Gómez, F., Vazquez-Vuelvas, O. F., Olmedo-Buenrostro, B. A., Guzman-Esquivel, J., Rodriguez-Sanchez, I. P., Lara-Esqueda, A., Montes-Galindo, D. A., Delgado-Enciso, I. (2015) Anti-inflammatory drugs and uterine cervical cancer cells: Antineoplastic effect of meclofenamic acid. *Oncol. Lett.* **10**, 2574-2578.

Sorokin, A. (2004) Cyclooxygenase-2: potential role in regulation of drug efflux and multidrug resistance phenotype. *Curr. Pharm. Des.* **10**, 647–657.

Steinbach, G., Lynch, P. M., Phillips, R. K., Wallace, M. H., Hawk, E., Gordon, G. B., Wakabayashi, N., Saunders, B., Shen, Y., Fujimura, T., Su, L. K., Levin, B., Godio, L., Patterson, S., Rodriguez-Bigas, M. A., Jester, S. L., King, K. L., Schumacher, M., Abbruzzese, J., DuBois, R. N., Hittelman, W. N., Zimmerman, S., Sherman, J. W., Kelloff, G. (2000) The effect of celecoxib, a cyclooxygenase-2 inhibitor, in familial adenomatous polyposis. *N. Engl. J. Med.* **342**, 1946-1952.

Thun, M. J., Henley, S. J., Patrono, C. (2002) Nonsteroidal anti-inflammatory drugs as anticancer agents: Mechanistic, pharmacologic, and clinical issues. *J. Natl. Cancer Inst.* **94**, 252–266.

Thun, M. J., Namboodiri, M. M., Heath, C. W. Jr. (1991) Aspirin use and reduced risk of fatal colon cancer. *N. Engl. J. Med.* **325**, 1593-1596.

Tsujii, M., Dubois, R. N. (1995) Alterations in Cellular Adhesion and Apoptosis in Epithelial Cells Overexpressing Prostaglandin Endoperoxide Synthase-2. *Cell* **83**, 493-501.

Tsujii, M., Kawano, S., Tsuji, S., Sawaoka, H., Hori, M., DuBois, R. N. (1998) Cyclooxygenase regulates angiogenesis induced by colon cancer cells. *Cell* **93**, 705–716.

Tucker, O. N., Dannenberg, A. J., Yang, E. K., Zhang, F., Teng, L., Daly, J. M., Soslow, R. A., Masferrer, J. L., Woerner, B. M., Koki, A. T., Fahey, T. J. 3rd. (1999) Cyclooxygenase-2 expression is up-regulated in human pancreatic cancer. *Cancer Res.* **59**, 987–990.

Vane, J. R., Botting, R. M. (1998) Mechanism of action of nonsteroidal anti-inflammatory drugs. *Am. J. Med.* **104**, 2S–8S.

Vane, J. R. (2000) The fight against rheumatism: from willow bark to COX-1 sparing drugs. *J. Physiol. Pharmacol.* **51**, 573–586.

Wang, D., Dubois, R. N. (2010) Eicosanoids and cancer. *Nat. Rev. Cancer.* **10**, 181-193.

Warner, T. D., Mitchell, J. A. (2008) COX-2 selectivity alone does not define the cardiovascular risks associated with non-steroidal anti-inflammatory drugs. *Lancet* **371**, 270–273.

Waskewich, C., Blumenthal, R. D., Li, H., Stein, R., Goldenberg, D. M., Burton, J. (2002) Celecoxib exhibits the greatest potency amongst cyclooxygenase (COX) inhibitors for growth inhibition of COX-2- negative hematopoietic and epithelial cell lines. *Cancer Res.* **62**, 2029–2033.

Woodward, D. F., Jones, R. L., Narumiya, S. (2011) International Union of Basic and Clinical Pharmacology. LXXXIII: classification of prostanoid receptors, updating 15 years of progress. *Pharmacol. Rev.* **63**, 471-538.

Wun, T., McKnight, H., Tuscano, J. M. (2004) Increased cyclooxygenase-2 (COX-2): a potential role in the pathogenesis of lymphoma. *Leuk. Res.* **28**, 179–190.

Yagi, K., Kawasaki, Y., Nakamura, H., Miura, T., Takeda, T., Esumi, S., Matsunaga, H., Kitamura, Y., Sendo, T. (2014) Differential combined effect of COX inhibitors on cell survival suppressed by sorafenib in the HepG2 cell line. *Biol. Pharm. Bull.* **37**, 1234-1240.

Yokoyama, C., Tanabe, T. (1989) Cloning of human gene encoding prostaglandin endoperoxide synthase and primary structure of the enzyme. *Biochem. Biophys. Res. Commun.* **165**, 888-894.